



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Enzimas del catabolismo purínico en las fracciones soluble y microsomal de cerebro y cerebelo de rata

Rafael Franco Fernández



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Rep. 19559

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE QUIMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

ENZIMAS DEL CATABOLISMO PURINICO EN LAS FRACCIONES
SOLUBLE Y MICROSOMAL DE CEREBRO Y CEREBELO DE RATA



Memoria presentada por D. Rafael Franco Fernández
para aspirar al grado de Doctor en Química

Barcelona, Septiembre de 1982

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700448676



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE QUIMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Av. Diagonal, 647 - Tel. 330 73 11

BARCELONA - 28

JORGE BOZAL FES, Catedrático de Bioquímica, Director del Departamento de Bioquímica, Universidad de Barcelona

CERTIFICO:

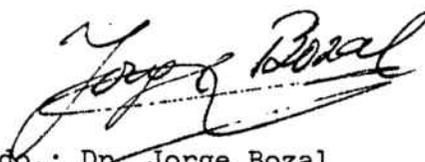
Que el trabajo experimental de la presente memoria titulada:

"ENZIMAS DEL CATABOLISMO PURINICO EN LAS FRACCIONES SOLUBLE Y MICROSOMAL DE CEREBRO Y CEREBELO DE RATA", ha sido efectuado por Don Rafael Franco Fernández, bajo mi dirección en este Departamento.

El Dr. Enrique I. Canela Campos, ha colaborado en su desarrollo como Codirector del trabajo.

Lo hago constar a efectos de defensa de la misma como Tesis Doctoral.

Barcelona, Septiembre de 1.982


Fdo.: Dr. Jorge Bozal
Director

I N D I C E

pag.

1	<u>INTRODUCCION</u>	1
1.1	<u>MICROSOMAS. CARACTERISTICAS GENERALES</u>	1
1.1.1	<u>MICROSOMAS DE HIGADO</u>	4
1.1.2	<u>MICROSOMAS DE CEREBRO</u>	7
1.2	<u>PROTEINAS DE LAS MEMBRANAS MICROSOMALES</u>	13
1.2.1	<u>PROTEINAS CONSTITUYENTES</u>	16
1.2.2	<u>PROTEINAS PERIFERICAS</u>	22
1.2.3	<u>PROTEINAS DE MEMBRANA RELACIONADAS CON LOS COMPUESTOS PURINICOS. HIPOTESIS DE BURNSTOCK</u>	25
1.3	<u>EL METABOLISMO DE LAS PURINAS EN CEREBRO</u>	31
2	<u>OBJETO</u>	49
3	<u>MATERIALES</u>	52
3.1	<u>MATERIAL BIOLÓGICO</u>	52
3.2	<u>PRODUCTOS</u>	52
3.2.1	<u>PROTEINAS</u>	52
3.2.2	<u>SUBSTRATOS, COFACTORES Y OTROS REACTIVOS</u>	52
3.3	<u>MATERIAL DE CROMATOGRÁFIA, ELECTROFORESIS, ENFOQUE ISOELECTRICO Y CENTRIFUGACION ISOPICNICA</u>	54

4	<u>METODOS</u>	55
4.1	<u>PREPARACION DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA PARA LOS ENSAYOS CINETICOS</u>	55
4.2	<u>OBTENCION DEL PURIFICADO PARCIAL PARA LOS ENSAYOS CINETICOS</u>	55
4.3	<u>PREPARACION DE LA FRACCION MICROSOMAL Y SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA</u>	56
4.4	<u>PREPARACION DE LA FRACCION MICROSOMAL Y SOLUBLE DE CEREBELO DE RATA</u>	59
4.5	<u>OBTENCION DE LA FRACCION DE VESICULAS SINAPTICAS DE CEREBRO DE RATA</u>	59
4.6	<u>OBTENCION DE SUSPENSIONES EN EXPERIMENTOS DE "EXPRESION"</u>	60
4.7	<u>PREPARACION DEL EXTRACTO DE TEJIDO HEPATICO DE POLLO</u>	60
4.8	<u>MODO DE EFECTUAR LOS LAVADOS DE LAS FRACCIONES PARTICULADAS</u>	61
4.9	<u>SONICACION</u>	62
4.10	<u>ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA</u>	62
4.10.1	<u>ELECTROFORESIS ZONAL</u>	62
4.10.2	<u>ELECTROFORESIS DISCONTINUA</u>	63
4.11	<u>ELECTROFORESIS EN TIRAS DE ACETATO DE</u>	

	<u>CELULOSA</u>	65
4.12	<u>REVELADO ESPECIFICO DE LA LDH</u>	65
4.13	<u>REVELADO ESPECIFICO DE LA MDH</u>	65
4.14	<u>REVELADO ESPECIFICO DE LA ADA</u>	66
4.15	<u>REVELADO ESPECIFICO DE LA GAH</u>	66
4.16	<u>REVELADO ESPECIFICO DE LA PNP</u>	66
4.17	<u>METODOS CROMATOGRAFICOS</u>	66
4.17.1	<u>FILTRACION EN GEL DE SEPHADEX G-25 y G-50</u>	66
4.17.2	<u>CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO</u>	67
4.17.3	<u>CROMATOGRAFIA EN GEL DE SEPHAROSE CL 4B</u>	68
4.18	<u>ENFOQUE ISOELECTRICO</u>	69
4.18.1	<u>ENFOQUE ISOELECTRICO ANALITICO EN PLACAS DE AGAROSA</u>	69
4.18.2	<u>ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO EN COLUMNA</u>	70
4.19	<u>ULTRACENTRIFUGACION ISOPICNICA EN "PERCOLL"</u>	74
4.20	<u>DETERMINACION DEL CONTENIDO EN PROTEINA</u>	75
4.21	<u>DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMA- TICAS</u>	76
4.21.1	<u>ENZIMAS DEL CATABOLISMO PURINICO</u>	76
4.21.1.1	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ADA	77

4.21.1.2	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GAH	77
4.21.1.3	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD 5'N	77
4.21.1.3.1	<u>Sistema AMP - 5'N - adenosina</u>	77
4.21.1.3.2	<u>Sistema GMP - 5'N - guanosina</u>	79
4.21.1.3.3	<u>Sistema IMP - 5'N - inosina</u>	79
4.21.1.3.4	<u>Sistema XMP - 5'N - xantosina</u>	80
4.21.1.4	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PNP	80
4.21.1.4.1	<u>Sistema inosina - PNP - hipoxantina</u>	80
4.21.1.4.2	<u>Sistema guanosina - PNP - guanina</u>	81
4.21.1.4.3	<u>Sistema xantosina - PNP - xantina</u>	81
4.21.1.4.4	<u>Sistema adenosina - PNP - adenina</u>	81
4.21.1.5	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD XO	81
4.21.2	<u>ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS DEL CATABOLISMO PURINICO EN LOS EXPERIMENTOS DE LAVADO DE LAS FRACCIONES PARTICULADAS</u>	82
4.21.3	<u>ENZIMAS MARCADORES DE ORGANULOS SUBCELULARES</u>	83
4.21.3.1	METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS CONTINUOS	83
4.21.3.1.1	<u>Determinación de la actividad LDH</u>	83
4.21.3.1.2	<u>Determinación de la actividad MDH</u>	83
4.21.3.1.3	<u>Determinación de la actividad GDH</u>	83
4.21.3.1.4	<u>Determinación de la actividad de la catalasa</u>	84
4.21.3.1.5	<u>Determinación de la actividad NADPH- citocromo c reductasa</u>	84

4.21.3.2	METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS DISCONTINUOS	85
4.21.3.2.1	<u>Determinación de la actividad de la fosfatasa ácida</u>	85
4.21.3.2.2	<u>Determinación de la actividad de la glucosa - 6 - fosfatasa</u>	86
4.21.3.2.3	<u>Determinación de la actividad de la tiamín - pirofosfatasa</u>	87
4.21.3.2.3.1	<u>Determinación del P_i por el método de Fiske y Subbarow</u>	88
4.22	<u>DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS</u>	89
4.23	<u>TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA</u>	89
4.23.1	<u>PROCESO DE FIJACION</u>	89
4.23.2	<u>PROCESO DE INCLUSION</u>	90
4.23.3	<u>PROCESO DE ULTRAMICROTOMIA</u>	90
4.23.4	<u>PROCESO DE TINCION</u>	91
4.23.5	<u>PROCESO DE OBSERVACION</u>	91

5	<u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	92
5.1	<u>CATABOLISMO PURINICO EN LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA</u>	93
5.1.1	<u>SISTEMA ADENOSINA - ADA - INOSINA</u>	94
5.1.2	<u>SISTEMA GUANINA - GAH - XANTINA</u>	95
5.1.3	<u>SISTEMA DE LA 5'NUCLEOTIDASA</u>	96
5.1.4	<u>SISTEMA DE LA PURINNUCLEOSIDO FOSFORILASA</u>	98
5.1.5	<u>SISTEMA DE LA XANTINA OXIDASA</u>	100
5.1.6	<u>ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VELOCIDADES DE REACCION</u>	101
5.1.7	<u>DISCUSION</u>	101
5.2	<u>ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIGADAS A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA</u>	111
5.2.1	<u>EFFECTO DE LOS MEDIOS DE LAVADO DE LOS MICROSOMAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS ESTUDIADOS</u>	111
5.2.2	<u>EFFECTO DE LAVADOS SUCESIVOS DE LOS MICROSOMAS CON MEDIOS DE DISTINTA FUERZA IONICA SOBRE LA LIBERACION DE LOS ENZIMAS ESTUDIADOS</u>	112
5.2.3	<u>EFFECTO DE LA SONICACION EN EL MEDIO A SOBRE LOS "MICROSOMAS LAVADOS"</u>	115
5.2.4	<u>EFFECTO DE LA SONICACION EN DISTINTOS MEDIOS Y EN DESOXICOLATO SOBRE LOS "MICROSOMAS LAVADOS"</u>	116

5.2.5	<u>EFECTO DEL DESOXICOLATO SOBRE LOS "MICROSOMAS LAVADOS" Y SOBRE LOS MICROSOMAS SONICADOS</u>	117
5.2.6	<u>EFECTO COMPARATIVO DEL DESOXICOLATO Y DE LA SONICACION A DISTINTOS INTERVALOS DE TIEMPO, SOBRE LOS "MICROSOMAS LAVADOS"</u>	121
5.2.7	<u>EFECTO DE CONCENTRACIONES ELEVADAS DE NaCl SOBRE LA LIBERACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIGADAS A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA</u>	121
5.2.8	<u>EFECTO DE CONCENTRACIONES ELEVADAS DE PROTEINA (BSA) SOBRE LAS ACTIVIDADES LDH Y MDH LIGADAS A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA</u>	123
5.2.9	<u>ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES LDH Y MDH LIGADAS A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA</u>	127
5.2.9.1	EFECTO DE LA INCUBACION DE LOS MICROSOMAS CON LOS SUBSTRATOS DE LA LDH Y LA LDH	127
5.2.9.2	EFECTO DE LAVADOS SUCESIVOS DE LOS MICROSOMAS CON DISOLUCIONES DE DESOXICOLATO Y DE TRITON X-100	130
5.2.10	<u>ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ADA, GAH Y PNP LIGADAS A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA</u>	133
5.2.10.1	EFECTO DE LAVADOS SUCESIVOS DE LOS MICROSOMAS CON DISOLUCIONES DE DESOXICOLATO	133

5.2.11	<u>CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LOS ENZIMAS DE LA FRACCION SOLUBLE Y DE LOS LIBERADOS DE LA FRACCION MICROSOMAL DE CEREBRO DE RATA</u>	136
5.2.11.1	ADENOSINA DESAMINASA (ADA)	137
5.2.11.2	GUANINA AMINOHIDROLASA (GAH)	139
5.2.11.3	PURINNUCLEOSIDO FOSFORILASA (PNP)	139
5.2.11.4	LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)	139
5.2.11.5	MALATO DESHIDROGENASA (MDH)	143
5.2.12	<u>EFEECTO DEL TRATAMIENTO DE LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA CON UN EXTRACTO HEPATICO RICO EN XANTINA DESHIDROGENASA (XDH)</u>	145
5.2.12.1	OBTENCION DE LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA POR HOMOGENEIZACION CON UN EXTRACTO HEPATICO ENRIQUECIDO EN XDH	145
5.2.12.2	OBTENCION DE LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA POR INCUBACION DEL SOBRENADANTE POST-MITOCONDRIAL CON UN EXTRACTO HEPATICO ENRIQUECIDO EN XDH	147
5.2.12.3	DISTINTO COMPORTAMIENTO DE LOS ENZIMAS ESTUDIADOS EN ESTOS EXPERIMENTOS	148
5.2.13	<u>DISCUSION</u>	151
5.3	<u>LOCALIZACION DE LOS ENZIMAS DEL METABOLISMO PURINICO EN ENCEFALO DE RATA</u>	159
5.3.1	<u>EXPERIMENTOS DE "EXPRESION" DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATA</u>	159
5.3.1.1	ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS POR LA "EXPRESION" DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATA	159

5.3.1.2	EFEECTO DEL INTERVALO DE TIEMPO DE ULTRA-CENTRIFUGACION DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA, SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS SOBRENADANTES	160
5.3.1.3	COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES LIBERADAS EN LA FRACCION SOLUBLE Y EN LA "EXPRESION" DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATA	163
5.3.2	<u>DIFERENCIAS DE COMPORTAMIENTO DE LA ADA Y LA 5'N LIGADAS A LOS MICROSOMAS Y A LAS VESICULAS SINAPTICAS DE CEREBRO DE RATA</u>	165
5.3.2.1	EFEECTO DEL EDTA SOBRE LA ACTIVIDAD 5'N	165
5.3.2.2	DIFERENCIAS DE COMPORTAMIENTO DE LA ADA Y LA 5'N RESPECTO A LOS RESTANTES ENZIMAS, EN LA FRACCION MICROSOMAL DE CEREBRO DE RATA	165
5.3.2.3	PRESENCIA EN LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA DE LOS ENZIMAS NECESARIOS PARA EL CATABOLISMO DE LOS MONONUCLEOTIDOS PURINICOS	169
5.3.2.4	EFEECTO DEL EDTA SOBRE LA 5'NUCLEOTIDASA LIGADA A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA	171
5.3.2.5	EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON CONCENTRACIONES ELEVADAS DE DETERGENTE EN LA UNION DE LA 5'N A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA	172
5.3.2.6	DIFERENCIAS DE COMPORTAMIENTO DE LA ADA Y LA 5'N RESPECTO A LOS RESTANTES ENZIMAS EN LA FRACCION DE VESICULAS SINAPTICAS DE CEREBRO DE RATA	176
5.3.3	<u>COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN CEREBRO Y CEREBELO DE RATA</u>	180

5.3.3.1	COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO Y DE CEREBELO DE RATA	180
5.3.3.2	COMPARACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LA FRACCION MICROSOMAL DE CEREBRO Y DE CEREBELO DE RATA	183
5.3.4	<u>DISCUSION</u>	185
5.4	<u>CARACTERIZACION DE LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA</u>	192
5.4.1	<u>VARIACION DE LA CANTIDAD DE MICROSOMAS SEPARADOS SEGUN EL METODO DE AISLAMIENTO EMPLEADO</u>	192
5.4.1.1	INFLUENCIA DE LA RELACION DE HOMOGENEIZACION (ml/g tejido) EN LA SEPARACION DE MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA	192
5.4.1.2	INFLUENCIA DE LA CONSTANTE DIELECTRICA DEL MEDIO DE HOMOGENEIZACION EN LA SEPARACION DE LOS MICROSOMAS	195
5.4.1.3	OBTENCION DE MICROSOMAS EN MEDIOS DE DIFERENTE CONTENIDO EN DIMETILSULFOXIDO (DMSO)	
5.4.1.3.1	<u>Efecto de la variación de la concentración de DMSO en la separación de microsomas</u>	201
5.4.1.3.2	<u>Reversibilidad de la acción del DMSO en la separación de microsomas</u>	205
5.4.1.4	COMPARACION DE LOS MICROSOMAS SEPARADOS CON Y SIN DMSO	210
5.4.1.4.1	<u>Enzimas marcadores de orgánulos subcelulares</u>	210

5.4.2	<u>PROPIEDADES FISICAS DE LOS MICROSOMAS</u>	213
5.4.2.1	DENSIDAD DE FLOTACION. ULTRACENTRIFUGACION ISOPICNICA EN PERCOLL	214
5.4.2.1.1	<u>Ultracentrifugación isopícnica de residuos microsomales obtenidos con y sin DMSO</u>	214
5.4.2.1.2	<u>Ultracentrifugación isopícnica de los microsomas presentes en los sobrenadantes postmitocondriales</u>	218
5.4.2.2	TAMAÑO DE PARTICULA. FILTRACION EN GEL DE EXCLUSION MOLECULAR (SEPHAROSE CL 4B)	219
5.4.2.2.1	<u>Filtración de los residuos microsomales lavados, en eluyentes de baja fuerza iónica</u>	
5.4.2.2.2	<u>Filtración de los residuos microsomales lavados, en eluyentes de fuerza iónica moderada (NaCl 0,15 M)</u>	225
5.4.2.2.3	<u>Filtración de los residuos microsomales lavados en medios de fuerza iónica elevada, en eluyentes de baja fuerza iónica</u>	229
5.4.2.2.4	<u>Filtración de los microsomas separados en medios con DMSO, en eluyentes de baja fuerza iónica</u>	233
5.4.2.2.4.1	<u>Filtración de los microsomas (DMSO), previamente lavados, en eluyentes de baja fuerza iónica</u>	233
5.4.2.2.4.2	<u>Filtración de los microsomas (DMSO), previamente tratados con desoxicolato (0,075%), en eluyentes de baja fuerza iónica</u>	236

5.4.2.3	PROPIEDADES ELECTRICAS. ENFOQUE ISOELEC- TRICO PREPARATIVO	238
5.4.2.3.1	<u>Enfoque isoelectrico de residuos microsoma-</u> <u>les separados en medios que contienen DMSO</u>	
5.4.2.3.2	<u>Caracterización de las formas LDH y MDH que</u> <u>se separan en el transcurso del enfoque</u> <u>isoelectrico. Comparación con las formas</u> <u>LDH y MDH obtenidas en la fracción soluble</u> <u>de cerebro de rata</u>	245
5.4.2.3.2.1	<u>Electroforesis</u>	245
5.4.2.3.2.1.a	<u>Lactato deshidrogenasa (LDH)</u>	245
5.4.2.3.2.1.b	<u>Malato deshidrogenasa (MDH)</u>	250
5.4.2.3.2.2	<u>Enfoque isoelectrico analítico en placas de</u> <u>agarosa</u>	254
5.4.2.3.2.2.a	<u>Lactato deshidrogenasa (LDH)</u>	254
5.4.2.3.2.2.b	<u>Malato deshidrogenasa (MDH)</u>	256
5.4.2.4	PROPIEDADES MORFOLOGICAS. MICROCOPIA ELECTRONICA	259
5.4.2.4.1	<u>Micrografías de residuos microsomales</u> <u>recién aislados</u>	260
5.4.2.4.2	<u>Micrografías de residuos microsomales</u> <u>lavados</u>	260
5.4.2.4.3	<u>Micrografías de residuos microsomales</u> <u>sonicados</u>	264
5.4.2.4.4	<u>Micrografías de residuos microsomales</u> <u>tratados con desoxicolato</u>	264

5.4.2.4.5	<u>Micrografías de residuos microsomales</u> <u>aislados en medios que contienen DMSO</u>	267
5.4.2.4.6	<u>Micrografías de residuos microsomales</u> <u>separados después de la filtración en</u> <u>gel de Sepharose CL 4B</u>	270
5.4.2.4.6.1	<u>Microsomas aislados en el medio</u> <u>habitual (sin DMSO)</u>	270
5.4.2.4.6.2	<u>Microsomas aislados en medios que</u> <u>contienen DMSO</u>	271
5.4.3	DISCUSION	273
5.5	<u>DISCUSION GENERAL</u>	282
6	<u>CONCLUSIONES</u>	294
7	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	298

A B R E V I A T U R A S

ADA	Adenosina desaminasa
ADP	5'-difosfato de adenosina
A.E.	Actividad específica
AGV	Vesículas agranulares pequeñas
AMP	5'-monofosfato de adenosina
AMP _c	3',5'-AMP-cíclico
APRT	Adenin fosforribosil transferasa
ATP	5'-trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Relación entre la concentración de N,N'-metilenbisacrilamida y la concentración total de acrilamida expresada en tanto por ciento
Cit' c	Citocromo c
DEAE	Dietil aminoetil
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
dR-1-P	1-fosfato de desoxi-ribosa
EDTA	Acido etilendiamino tetra-acético, sal disódica
FAI	Fosfatasa alcalina
FA	Fosfatasa ácida
x g	Gravedades

GAH	Guanina aminohidrolasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GMP	5'-monofosfato de guanosina
GPRT	Guanin fosforribosil transferasa
G-1-P	1-fosfato de glucosa
G-6-P	6-fosfato de glucosa
HGPRT	Hipoxantin guanin fosforribosil transferasa
IMP	5'-monofosfato de inosina
INT	Cloruro de violeta de p-iodo nitrotetrazolium
K_m	Constante de Michaelis
LDH	Lactato deshidrogenasa
LGV	Vesículas granulares grandes
LOV	Vesículas opacas grandes
M	Molaridad
Mal	Malato
MC	Microsomas
"MC lavados"	Microsomas lavados tres veces con el medio de homogeneización.
MC (DMSO)	Microsomas obtenidos en presencia de DMSO
MC (sin DMSO)	Microsomas obtenidos en ausencia de DMSO
MDH	Malato deshidrogenasa
Medio A	Medio conteniendo : sacarosa 0,28M, tris (25 mM), EDTA 1mM y HCl de pH 7,4

Medio B	Análogo al medio A pero sin el EDTA
Medio D	Medio conteniendo DMSO en proporción variable
MTT	Bromuro de 3(4,5-dimetiltiazolil - 2 -)2,5-difeniltetrazolium
NAD	Nicotín adenín dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotín adenin dinucleótido (forma reducida)
NADPH	Fosfato de nicotín adenin dinucleótido(forma reducida)
NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolium
OA	Ovoalbúmina
OAA	Acido oxalacético
P	Proteína
P _i	Ortofosfato inorgánico
PBP	Proteína de unión periplasmática
PD-10	Columna preempaquetada de Sephadex G-25
Pir	Piruvato
PM	Peso molecular
PMS	Metasulfato de fenacina
PNP	Purinnucleósido fosforilasa
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Acido ribonucléico
R-1-P	1-fosfato de ribosa
R-5-P	5-fosfato de ribosa
SDS	Dodecil sulfato sódico

SGV	Vesículas granulares pequeñas
SNC	Sistema nervioso central
T	Concentración total de acrilamida expresada en tanto por ciento
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilen diamina
tris	tris (hidroxi metil) amino metano
U	Unidad enzimática (se define en pg. 55)
UV	Ultravioleta
V	Velocidad máxima
v	Velocidad inicial
XDH	Xantina deshidrogenasa
XMP	5'-monofosfato de xantosina
XO	Xantina oxidasa
5'N	5'Nucleotidasa
ϵ	Absortividad molar
λ	Longitud de onda

1

I N T R O D U C C I O N

1.1

MICROSOMAS. CARACTERISTICAS GENERALES

El término "microsommas", del que deriva el de "fracción microsomal", no representa un orgánulo subcelular concreto como ocurre con el término "mitocondrias" y su correspondiente "fracción mitocondrial". De Duve (1964) y, posteriormente, Reid (1967), definieron el término e hicieron corresponder los microsommas a la fracción que sedimenta al someter los homogeneizados de un tejido a fuerzas centrífugas superiores a 100.000 g. En la obtención de la fracción microsomal se usa el método seguido por Schneider y Hogeboom (1950); se eliminan previamente los núcleos y las mitocondrias a 10.000 o 15.000xg, 30 min y se centrifuga el sobrenadante a más de 100.000 x g durante 60 - 120 min. El residuo obtenido fué denominado por Schneider y Hogeboom como de "partículas submicroscópicas". De Duve (1964) y Reid (1967) designaron el residuo con el término "microsommas" , que sigue utilizándose.

La estructura y propiedades biológicas de los microsommas dependen no solo de factores intrínsecos (especie, tipo o edad) sino también de las condiciones externas (dieta o estatus hormonal) (Tata 1972, Talwar et al 1962).

Los microsommas de hígado, que han sido muy bien estudiados, consisten, a menudo, en una mezcla de elementos membranosos y de ribosomas (o polisomas), presentes en forma de unidades separadas o de complejos y que derivan casi exclusivamente del retículo endoplasmático (RE). Los microsommas no son, por tanto, estructuras estables y experimentan un recambio relativamente rápido en comparación con la vida de la célula (Omura et al 1967, Siekevitz et al 1967, Arias et al 1969, Hennace y Ho -

rrocks 1978). Un gran número de actividades enzimáticas se asocian con las membranas del RE, mientras que los ribosomas unidos al RE intervienen muy activamente en la síntesis proteica (tabla I) (Tata 1967 a y b; Andrews y Tata 1968, 1971 ; Campbell 1970; Bouchilloux et al 1973). Esta síntesis es muy evidente en tejidos secretores de proteínas, como el hígado (Manganiello y Phillips 1965; Sabatini et al 1966) y tiroides (Morais y Goldberg 1967; Bouchilloux et al 1973), pero también se ha demostrado que ocurre en tejido pulmonar de conejo (Stenzel y Rubin 1966) y en corteza cerebral de rata (White et al 1972). La unión de los ribosomas a membranas que no se pueden considerar como pertenecientes al RE ha sido sugerida para células que no segregan proteínas (Andrews y Tata 1968, 1971). Existe una correlación en la velocidad con que aumenta la cantidad de membranas microsomales y de ribosomas bajo la influencia de hormonas del crecimiento y del desarrollo (Tata 1967 a y b, 1970). Por todas estas razones, un método ideal para preparar microsomas y fracciones submicrosomales, ha de satisfacer según Tata (1972), tres requerimientos :

- Obtención cuantitativa de las membranas con una pérdida mínima de estructuras y de actividades enzimáticas.
- Obtención cuantitativa de polisomas y ribosomas libres que sean capaces de llevar a cabo una elevada incorporación de aminoácidos "in vitro".
- Que la perturbación de la unión de los polisomas a las membranas y de la localización de las proteínas que se hallan en curso de síntesis "in vitro", sea lo más pequeña posible.

Los mejores métodos para fraccionar los microsomas de los distintos tejidos, difieren necesariamente. Además, aunque se han descrito métodos para un gran número de tejidos, los tres

T A B L A I

ALGUNAS ACTIVIDADES Y FUNCIONES ASOCIADAS A LOS DOS
COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS MICROSOMAS DE HIGADO :
MEMBRANAS Y RIBOSOMAS (Tata 1972)

FRACCION	ACTIVIDAD	FUNCION
Membrana	Glucosa-6-fosfa- tasa	Metabolismo de los glúcidos y gluco- neogénesis
	Citocromo b_5, P_{450} hidroxilasas	Desintoxicación
	NADPH-cit c reductasa	Transporte electrón- ico extramitocon- drial
	Reducción de esteroides	Biogénesis de esteroides
Ribosomas o polisomas	Enzimas relacio- nados con la in- corporación de aminoácidos en proteínas	Síntesis proteica
	Ribonucleasa	Metabolismo del RNA

requerimientos solo se ven satisfechos cuando se trata de hígado. En los demás tejidos, su complejidad estructural no permite establecer analogías cualitativas completas entre los componentes microsomales y los subcelulares. Los métodos de subfraccionamiento microsomal tampoco dan resultados tan satisfactorios como con tejido hepático.

1.1.1 MICROSOMAS DE HIGADO

Basándose en estudios morfométricos y bioquímicos, Weibel et al (1969) concluyeron que el área del RE en 1 cm^3 de hígado de rata mide 11 m^2 , de los cuales siete son de RE rugoso, con unos 20 billones de ribosomas. Este es el material que compone la fracción microsomal de hígado de rata, cuyo aislamiento descrito por Tata (1972) es una combinación de los métodos de Dalner (1963), de Bloemendal et al (1964, 1967) y de Blobel y Potter (1966).

Es una práctica común el someter a ayuno a los animales usados para la preparación de microsomas, especialmente de hígado, para reducir la contaminación por glucógeno. Ello conduce a desórdenes en la incorporación de aminoácidos por los ribosomas obtenidos posteriormente, ya que cualquier modificación en la alimentación hace variar la síntesis proteica de la célula así como la unión de los ribosomas al RE (Munro et al 1964; Weber et al 1964; Tata 1967; Reid 1967; Quirin-Stricker y Mandel 1967). Así pues, en el método de Tata (1972) se parte de hígados de ratas normalmente alimentadas que se homogeneizan en un medio isotónico de : sacarosa (0,35 M), KCl (25 mM), tris (50 mM), MgCl_2 (10 mM) y HCl de pH 7,6 (la concentración del ión Mg (II) es esencial para estudiar la incorporación de aminoácidos "in vitro"). La concentración óptima del homogeneizado es de 2,5 ml/g tejido; sin embargo, es aconsejable el empleo de

homogeneizados más diluidos (10 o 20%) para efectuar estudios analíticos. La homogeneización es conveniente realizarla empleando un homogeneizador de Potter-Elvehjem, provisto de un émbolo de teflón cuya holgura (0,10 - 0,15 mm) debe ser suficiente para que aunque se destruyan las mitocondrias, se evite la contaminación por fragmentos de núcleos y mitocondrias.

Del homogeneizado hay que eliminar los eritrocitos, las células intactas, los núcleos y las mitocondrias, lo que se consigue por centrifugación a 10.000xg, 20 min. Howell et al (1964), al centrifugar homogeneizados libres de núcleos a 20.000xg, 20 min, encuentran que la mayor parte de las membranas del RE rugoso sedimentan con las mitocondrias. Por el contrario, el riesgo de contaminación por mitocondrias es grande si la centrifugación se realiza por debajo de 8.000xg (Howell et al 1964, Roodyn et al 1965, Loeb et al 1967).

El sobrenadante obtenido, libre de mitocondrias, puede someterse a varios procesos. Para obtener microsomas "brutos", el sobrenadante se centrifuga a 105.000xg durante 60 - 90 min. El residuo microsomal puede entonces ser suspendido en el medio de homogeneización, mediante un homogeneizador Potter-Elvehjem, y se centrifuga de nuevo. Para obtener polisomas, el método más comúnmente usado es liberar las partículas de las membranas con 0,5 - 1% de desoxicolato, aunque pueden utilizarse otros detergentes iónicos o no-iónicos (Tritón X-100 o Lubrol). En los primeros estudios, los microsomas se trataban con el detergente después de aislados (Siekevitz y Palade 1960, Reid 1967). Debido a la existencia de una ribonucleasa asociada al RE (Lamirande et al 1966) esta manera de proceder no es correcta, y es preferible el tratamiento del sobrenadante, libre de mitocondrias, con el detergente; así se previene cualquier alteración de los polisomas (Bont et al 1965, Blobel y Potter 1966).

Otros métodos de obtención de microsomas "brutos" son el de la precipitación con iones divalentes, el de filtración en gel de exclusión molecular y la centrifugación en gradiente de densidad. Varios son los autores que proponen un método de obtención de microsomas por agregación con iones divalentes, principalmente por el Ca (II) (Kamath y Narayan 1972, Schenkman y Cinti 1972, Albretch et al 1974, Ecobichon 1976, Kovarova 1976). Al añadirse los cationes (8 mM y pH 7,5) al sobrenadante post-mitocondrial se produce una agregación de las vesículas microsomas. Los microsomas así obtenidos son bastante análogos a los no agregados, si bien, en el proceso se desprenden los ribosomas en gran proporción. Una variante de este método aprovecha la disminución de la solubilidad a pH ligeramente inferior a 5,5, con lo que se produce una precipitación isoeléctrica de microsomas "ácidos" análogos a los obtenidos por otros métodos (Fry y Bidges 1974). Un método análogo es el descrito por Van der Hoeven (1981), que trata al sobrenadante post-mitocondrial con "polietilenglicol 6000" para que precipiten con más facilidad los microsomas.

La obtención de microsomas por filtración en gel es un método limpio, pero largo. La técnica es simple y consiste en filtrar el sobrenadante post-mitocondrial a través de una columna de Sepharose 2B. Se consigue la obtención de dos picos de proteína, uno correspondiente a los microsomas, que sobrepasa el límite de exclusión de la columna y otro que corresponde a la fracción soluble del tejido. La ventaja del método es que se obtienen unos microsomas exentos de proteínas de la fracción soluble adsorbidas en las membranas (Tangen et al 1973).

Blume (1979) ha conseguido la separación de los microsomas contaminantes de la fracción mitocondrial por centrifugación de la suspensión de mitocondrias "brutas" en un gradiente de "Percoll". Los microsomas obtenidos ocupan una única banda en

el tubo de centrífuga y no se ha conseguido la separación en subfracciones.

La dificultad de subfraccionar los microsomas "brutos", consiste en obtener preparaciones activas tanto de enzimas asociados a las membranas como en la incorporación "in vitro" de aminoácidos en proteínas. Los resultados obtenidos muestran que el método de Tata (1972) es, también, el adecuado. Como se indica en la figura 1, se obtienen dos fracciones por medio de un gradiente discontinuo de sacarosa: la correspondiente al RE liso (microsomas lisos) y la correspondiente al RE rugoso (microsomas rugosos). Los microsomas rugosos se pueden subfraccionar, a su vez, con la obtención de tres fracciones, una de las cuales corresponde a los ribosomas libres.

Para la separación de las membranas rugosas y lisas, Lee et al (1969), han usado la centrifugación zonal, mientras Ichisita et al (1972) han logrado idénticos resultados por medio de electroforesis zonal. Ultimamente, Kiang et al (1978) han logrado la separación de hasta cinco subfracciones de microsomas de hígado y de cerebro de rata con un gradiente discontinuo (cuatro etapas) de sacarosa. No obstante, la caracterización ultraestructural de estas cinco subfracciones no es completa. Por su parte, Azzar y Benedetto (1981) han subfraccionado los microsomas por isotacoforesis; no se obtienen fracciones separadas y los microsomas se reparten en una amplia zona que se eluye en once fracciones en las que se demuestra una heterogeneidad en el contenido de los enzimas (marcadores de orgánulos subcelulares) ensayados.

1.1.2

MICROSOMAS DE CEREBRO

A causa de la gran complejidad estructural del cerebro, en cuanto al propio tejido y en cuanto a los niveles subcelula-

HOMOGENEIZACION DEL TEJIDO HEPATICO

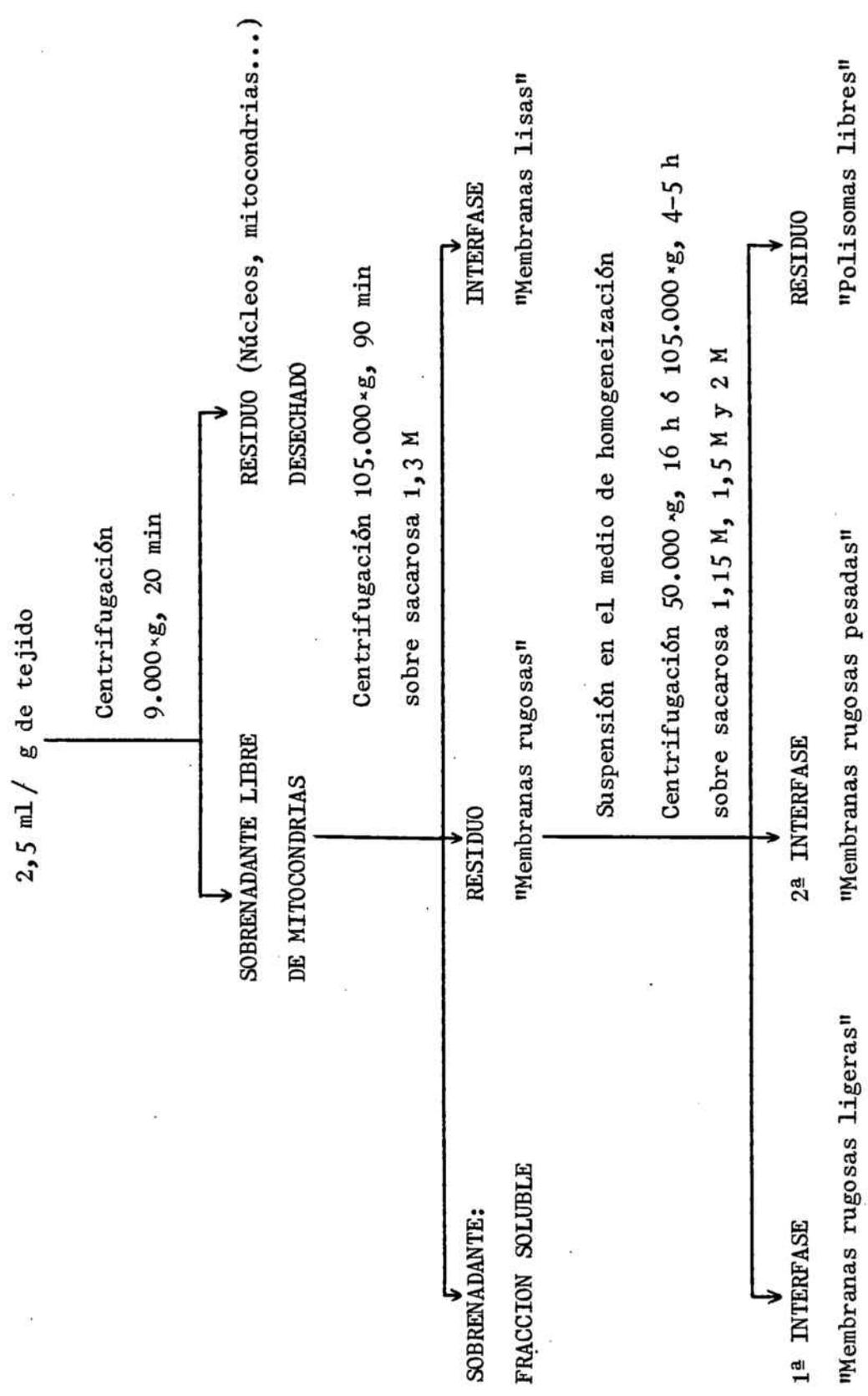


FIGURA 1 .- ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA AISLAR FRACCIONES SUBMICROSOMALES DE HIGADO DE RATA (Tata 1972).

res, la caracterización ultraestructural de los microsomas dista mucho de ser tan completa como en el hígado. Muchos autores han descrito métodos de obtención de microsomas de cerebro que difieren en mayor o menor grado según el tipo de estudio realizado (Got et al 1967, Zomzely et al 1964, Adams y Lim 1966, Campbell et al 1966, Mahler y Brown 1968; Andrews y Tata 1968, 1971; Merits et al 1969, Levitan et al 1972, Hemminki y Suovaniemi 1973, Tamai et al 1975, Katsuta et al 1978) . El procedimiento de Andrews y Tata (1968, 1971) es adecuado para el estudio de la incorporación de aminoácidos a proteínas a través de los ribosomas libres o unidos a las membranas de la corteza cerebral de rata. En este método, el tejido se homogeneiza (3,5 ml/g) mediante un homogeneizador de Potter-Elvehjem (0,15 mm de holgura) a 800 rpm y tres impulsos. Más de cinco impulsos reducen la incorporación de aminoácidos en las preparaciones finales. El medio de homogeneización consiste en sacarosa 0,25 M, KCl 0,1 M, $MgCl_2$ 12 mM y tris (50mM)-HCl de pH 7,4. Los microsomas "brutos" se obtienen por centrifugación (105.000xg, 120 min) del sobrenadante postmitocondrial. Para el subfraccionamiento microsomal, 14 ml del sobrenadante libre de mitocondrias se colocan sobre 6,5 ml de sacarosa 0,8 M y el conjunto se centrifuga a 105.000xg, 120 min. La capa de la interfase , así como el sobrenadante se desechan y el residuo se resuspende en el medio de homogeneización. La suspensión se coloca sobre un gradiente discontinuo (1,0 y 2,0 M) de sacarosa y el conjunto se centrifuga a 60.000 g, 16 h. Con ello se obtienen tres subfracciones microsomales : una algo por debajo de la interfase 0,25 - 1,0 M; otra en la interfase 1,0 - 2,0 M y otra en el residuo. Estas fracciones son denominadas respectivamente : membranas rugosas ligeras, membranas rugosas pesadas y polisomas libres. Estas denominaciones no significan que exista identidad morfológica con fracciones similares obtenidas a

partir de tejido hepático. La proporción relativa de RE liso y rugoso es pequeña en tejidos secretores (hígado, páncreas y tiroides) y elevada en tejidos no secretores (cerebro, riñón y músculo) (Tata 1972).

Por su parte, Tamai et al (1974), en estudios de caracterización de las membranas submicrosomales en cuanto a su composición lipídica, también logran la separación de los microsomas en tres fracciones, aunque distintas a las anteriores. La homogeneización se lleva a cabo en sacarosa 0,88 M (4 ml/g) en un homogeneizador de Potter - Elvehjem de 0,25 mm de holgura. La suspensión se centrifuga a 25.000xg, 20 min y al sobrenadante se le añade un volumen igual de sacarosa 1,76 M. Dos ml de la mezcla se depositan sobre 7 ml de sacarosa 0,15 M y el conjunto se centrifuga (105.000xg, 16 h); se obtienen tres fracciones: una en la interfase 0,15 - 1,3 M, otra en el residuo y otra entre ambas. Respectivamente, las fracciones son denominadas: ligera de superficie lisa, de superficie rugosa y pesada de superficie lisa.

La aparente diferencia en los resultados de Andrews y Tata (1968, 1971) y los de Tamai et al (1974) puede no ser tal. Los primeros, en su esquema, desechan una fracción que estaría compuesta de membranas lisas. Los segundos, en cambio, subfraccionan estas membranas lisas y no hacen lo propio con las rugosas que obtienen en un único residuo. Por su parte, Kiang et al (1978) mediante un gradiente discontinuo de sacarosa entre 0,5 y 1,3 M, y con un medio de homogeneización ligeramente distinto (sacarosa 0,3 M, fosfato sódico 1 mM y EDTA 0,1 mM de pH 7,5) obtienen cinco subfracciones de microsomas de cerebro de rata.

Como variante de estos métodos, que son los más ampliamente usados, cabe reseñarse el de Got et al (1967) para aislar fracciones submicrosomales de cerebro ovino. El método está basado en el de Dallner y Nilson (1966) y la obtención de mi-

rosomas por centrifugación del sobrenadante post-mitocondrial se lleva a cabo en presencia de CsCl 15 mM. El subfraccionamiento se efectúa a partir del sobrenadante post-mitocondrial (solo o enriquecido con el residuo microsomal), mediante gradientes discontinuos de sacarosa y agregación de las subfracciones por cationes. Al final, se obtienen tres subfracciones sin denominación específica: la II que se agrega con Cs (I), la Ib que se agrega con Mg (II) y no con Cs (I) y la Ia que no se agrega.

La complejidad del tejido cerebral se pone de manifiesto al estudiar el esquema de obtención de membranas plasmáticas de cerebro de rata adulta (figura 2) (Morgan et al 1971). En él, se desecha la fracción microsomal, aunque cabe esperar una complejidad proporcional en ella, que supone muchas limitaciones para la obtención de fracciones subcelulares concretas. Con el tejido hepático no se presentan limitaciones de este tipo.

Una de las fracciones empleadas en el presente trabajo, es la constituida por vesículas sinápticas que, tras la homogeneización, están contenidas, en gran parte, en la fracción sinaptosomal (figura 2). Esta fracción corresponde a las terminaciones nerviosas colapsadas (Levitan et al 1972, Morgan et al 1971). En el método de centrifugación diferencial descrito (Andrews y Tata 1968, 1971), junto con la fracción mitocondrial precipitan los sinaptosomas. A partir de esta fracción conjunta, Soller et al (1973) proponen un método sencillo de obtención de vesículas sinápticas, tras un tratamiento hipoosmótico de la fracción (véase 5.5). En el caso de existir vesículas sinápticas libres (no contenidas en los sinaptosomas) en el homogeneizado, aquéllas irían por su tamaño, a formar parte de la fracción microsomal "bruta" tras un proceso de centrifugación diferencial (Kakiuchi et al 1981).

La composición química de los microsomas de hígado de rata (tabla II) es compatible con los modelos estructurales así como con sus actividades enzimáticas y de síntesis proteica. La cantidad de proteína, fosfolípidos, RNA y glucógeno, referidos en la tabla II (Tata 1972) es similar a la descrita por otros autores (Reid 1967). La distribución relativa del RNA de diferentes tamaños en el RE liso, es distinta a la de los polisomas o ribosomas del RE rugoso o libres, en los que el 90% del RNA está compuesto de partículas 28 S y 18 S. En las membranas lisas, hay gran cantidad de RNA 7 S, el cual podría resultar de la degradación del RNA ribosomal (Scott-Burden y Hawtrey 1969).

La contaminación de las membranas microsomales de músculo y de cerebro de rata, por otras fracciones subcelulares, impide una comparación significativa con los datos referentes al hígado. No obstante, en la tabla III se establece una comparación entre la fracción pesada de membranas rugosas y la de polisomas libres del método de Tata (1972). La proporción RNA/fosfolípido de los microsomas rugosos refleja la densidad de empaquetamiento de los ribosomas en las membranas del RE. Así, la fracción pesada rugosa de músculo y cerebro se parece más a la ligera rugosa de hígado. La baja proporción RNA/fosfolípido en las membranas microsomales de cerebro refleja la contaminación por material lipídico dentro del que se incluyen las vainas mielínicas.

Las tablas IV y V muestran datos análogos a los de las tablas II y III si bien con las subfracciones obtenidas por Kiang et al (1978) y Tamai et al (1974) de los microsomas de cerebro de rata. Al comparar los resultados, se observan diferencias entre las fracciones obtenidas por distintos autores.

Table 2. CHEMICAL COMPOSITION OF WHOLE MICROSOMES AND SUBMICROSOMAL FRACTIONS* OF RAT LIVER (Tata 1972)

Fraction	Protein	Phospholipid (mg per g-equiv. of liver)	RNA	Glycogen
Whole microsomes	19.4±2.2	7.5±1.3	3.8±0.2	43.8±9.6
Smooth membranes	7.6±1.5	3.5±0.7	0.1±0.06	2.0±0.5
Light rough membranes	2.9±0.8	0.9±0.3	1.0±0.1	4.3±1.2
Heavy rough membranes	4.5±0.5	1.3±0.3	2.1±0.4	8.0±2.0
Free polysomes	0.8±0.2	0.02	0.5±0.1	25.2±6.0

* Fractionation (as Chart 1) using Sprague-Dawley rats of 150 to 180 g fed *ad libitum*. These values do not represent total amount of hepatic microsomes but about 60% of homogenate RNA is recovered as whole microsomes.

Table 3. RELATIVE RNA, PROTEIN AND PHOSPHOLIPID CONTENT OF MEMBRANE-BOUND AND FREE RIBOSOMES FROM BRAIN AND MUSCLE (Tata 1972)

Tissue	Fraction	RNA Protein	P-lipid Protein	RNA P-lipid
Brain	Membrane-bound	0.13	0.23	0.55
	Free polysomes	0.70	0.10	7.00
Muscle	Membrane-bound	0.35	0.38	0.91
	Free polysomes	0.27	0.10	2.00

Microsomal subfractions were prepared as described in the text. Each value is the mean of duplicate determinations for 8 to 12 preparations of brain and 4 of muscle. The variation was within ±5%. Membrane-bound fraction refers only to the 'heavy rough microsomes' (from Andrews and Tata, 1971).

TABLE IV Composition of Brain Microsomal Subfractions.^a (Kiang et al 1978)

	subfraction no.					total microsomes
	1	2	3	4	5	
sucrose molarity	0.5	0.7	0.9	1.1	pellet ^b	
protein (%)	16 ^c	19	28	30	7	100
RNA (μg of P/mg of protein)	0.5	0.9	1.2	2.8	10.9	4.7
[Na ⁺ -K ⁺]ATPase	4.4	6.5	5.3	7.1	3.3	5.8
NADPH-cytochrome <i>c</i> reductase	0.65	0.36	0.27	0.31	0.39	0.33
phosphodiesterase	0.41	0.50	0.41	0.28	0.14	0.30
K ⁺ -dependent phosphatase	1.9	3.2	3.0	2.5	0.86	2.2
acid phosphatase	1.2	2.0	3.0	3.9	2.3	2.9
acetylcholinesterase	3.4	5.7	3.4	2.8	2.2	9.4

^a Mean values from three to five determinations. Enzyme activities are expressed as μmol of substrate utilized or product formed per mg of protein per h. ^b Sedimented through 1.3 M sucrose. ^c Only 35% of the protein in this subfraction resediments with the membranes used for RNA and enzyme assays.

TABLE V a

Amounts of Protein, RNA, Na,K-ATPase, and Lipid Classes in Rat Brain Submicrosomal Membrane Fractions

Submicrosomal membranes	Protein		RNA		Na,K-ATPase	
	mg/g wet wt of tissue	Recovery*	μg/g wet wt of tissue		μmol Pi released/h/g wet wt of tissue	Recovery
		%				%
Rough-surfaced	1.4	1.3	233		2.5	0.3
Heavy smooth-surfaced	3.5	3.2	62		54.4	6.6
Light smooth-surfaced	3.4	3.1	14		36.3	4.4
Total	8.3	7.6	309		93.2	11.3
Submicrosomal membranes	Cholesterol		Phospholipid		Lipid-NANA	
	μg/g wet wt of tissue	Recovery	μg/g wet wt of tissue	Recovery	μg/g wet wt of tissue	Recovery
		%		%		%
Rough-surfaced	27	0.2	95	0.3	0	0.0
Heavy smooth-surfaced	565	3.4	1,749	4.6	26	6.5
Light smooth-surfaced	1,679	10.1	2,922	7.7	31	7.7
Total	2,271	13.7	4,766	12.6	57	14.2

* Recovery of components with respect to brain homogenate.

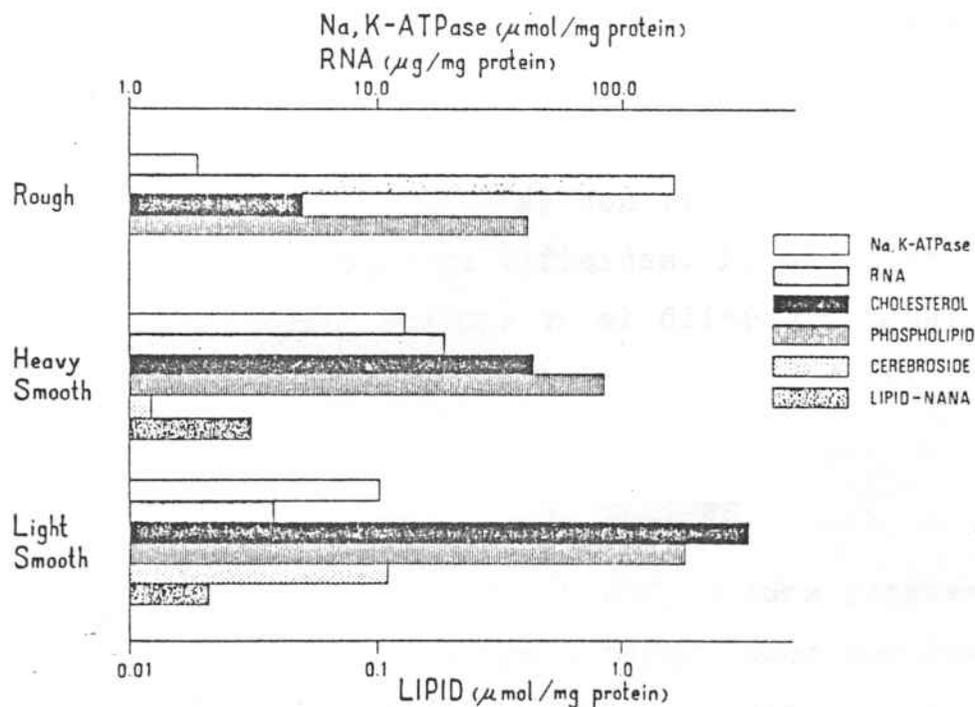


TABLE V b

Comparative Study of the Lipid Class Compositions in Rough- and Smooth-Surfaced Microsomal Membranes

Submicrosomal membranes	RNA (μg/mg protein)	Na,K-ATPase (μmol Pi released/h/mg protein)	Lipid class (μmol/mg protein)			
			Cholesterol	Phospholipid	Cerebroside	Ganglioside*
Rough-surfaced	166	1.8	0.05	0.31	ND	0.00
Heavy smooth-surfaced	18	15.5	0.42	0.70	0.0-0.02	0.03
Light smooth-surfaced	4	10.7	1.28	1.10	0.12	0.02

* Ganglioside content is expressed as micromoles of lipid-bound NANA.

Estas diferencias se acentúan al comparar con los datos obtenidos con los microsomas de cerebro de oveja (Got et al 1967).

La presencia del RNA en las membranas microsomales se debe, principalmente, al ácido nucleico de los ribosomas presentes en ellas. Aunque existen proteínas constituyentes de los ribosomas, la mayor parte de las proteínas microsomales se encuentran incluidas en vesículas o bien, interaccionan con las membranas y los lípidos que las constituyen (proteínas de membrana). Muchas de las proteínas presentes en los microsomas tienen actividad enzimática, la cual se conserva tras el tratamiento normal de aislamiento de los microsomas (Tata 1972, Tangen et al 1973).

El comportamiento de las proteínas de las membranas ha permitido clasificarlas en dos grupos, basándose en la estabilidad de la unión; son estos: las proteínas periféricas y las proteínas constituyentes. Las proteínas periféricas se hallan unidas débilmente a la membrana correspondiente, mientras que la unión de las proteínas constituyentes con la membrana es estable y suelen desempeñar funciones definidas. El distinto comportamiento parece, por tanto, residir en el diferente papel estructural de ambos tipos de proteínas.

1.2.1 PROTEINAS CONSTITUYENTES

Las proteínas constituyentes "están unidas fuertemente a la membrana y exhiben importantes interacciones con los lípidos de la membrana" (Singer 1972, 1974). Singer, que propuso esta división de las proteínas de la membrana, considera que, por los criterios de la tabla VI, del 70 al 80% de las proteínas de la membrana son constituyentes. Recientemente se han construido sistemas por recombinación entre bicapas fosfolipídicas y proteínas constituyentes (Pink y Chapman 1979), como la cito-

cromo oxidasa (Hoffman et al 1981) o la banda 3 de la membrana eritrocitaria (Lukakovic et al 1981).

TABLA VI

PROPIEDAD	P. PERIFERICA	P. CONSTITUYENTE
Condiciones para disociarse de la membrana	Tratamientos suaves Basta con fuerza iónica elevada o quelantes de iones metálicos.	Se necesitan agentes que rompan la unión hidrofóbica: detergentes, dis. orgánicos, iones caotrópicos.
Asociación simultánea a lípidos cuando se disocian	Libre de lípidos normalmente.	Asociada a lípidos normalmente cuando se solubiliza.
Solubilidad tras la disociación	Soluble y molecularmente dispersada en tampones acuosos neutros.	Insoluble habitualmente o agregada en tampones acuosos neutros.

Criterios de clasificación de las proteínas de membrana (Singer 1974).

En determinadas ocasiones se evidencia que las proteínas enzimáticas que son constitutivas, requieren lípidos para su actividad (Singer 1974); tal es el caso de la 5'N purificada de hígado de rata cuya actividad depende de los fosfolípidos (Widnell y Unkeles 1968, Widnell 1974, Hardonk et al 1978). No obstante, la aplicación de los criterios de la tabla VI tie-

ne sus limitaciones. Así, la acetilcolinesterasa se solubiliza con NaCl 1,2 M, y junto con ella se solubilizan lípidos, por lo que habría que considerarla como una proteína constitutiva y no periférica (Singer 1974). En otras ocasiones se obtienen fragmentos, por digestión proteásica de enzimas constitutivos, que son solubles, pero hay que tener en cuenta que aquéllos son solo fragmentos de la proteína constituyente (Strittmatter y Velick 1956, Strittmatter et al 1972, Singer 1974). A veces se requieren técnicas tan complejas como las de inmunociquímica para demostrar que la tubulina no es una proteína constitutiva de la membrana granular de las células adrenales en cultivo (Bader et al 1981).

Los ejemplos de proteínas constituyentes mejor estudiados estructuralmente, los constituyen una proteína de la membrana eritrocitaria (Singer 1974), el citocromo b_5 (Strittmatter y Velick 1956, Strittmatter et al 1972), y una glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular que, en la infección, se sintetiza como un componente del RE rugoso (Lodish y Rothman 1979). Todas ellas constan de una "cola" rica en aminoácidos de carácter hidrofóbico que penetra e interacciona con la parte no polar de la bicapa lipídica.

En general, se concluye que las proteínas constituyentes son de carácter anfipático, con la parte hidrofílica expuesta al medio acuoso y la hidrofóbica embebida en la membrana (Singer 1974) (figura 3).

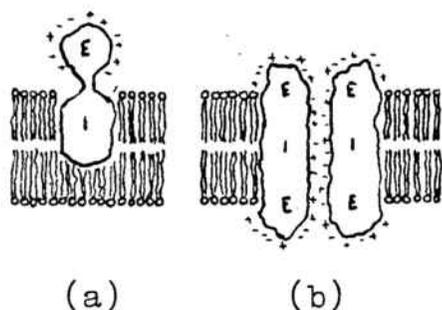


FIGURA 3.- ESQUEMA DE DOS DE LAS FORMAS EN QUE LAS PROTEINAS CONSTITUTIVAS SE PUEDEN ASOCIAR A LAS MEMBRANAS.

(a) Molécula simple

(b) Agregado de subunidades

(Singer 1974).

Goñi et al (1977) en un estudio en el que comparan la hidrofobicidad de los aminoácidos que componen las proteínas constituyentes, periféricas y citosolubles, concluyen que, en el orden mencionado, la hidrofobicidad disminuye. Estos resultados contrastan con el comportamiento de la C_{55} alcohol isoprenoides fosfoquinasa de Staphilococcus aureus que tiene un 66% de restos aminoácidos no polares y es soluble. Por su parte, la caltrina (proteína constitutiva de membrana) solo contiene un 46% de tales restos aminoácidos. En conjunto, parece que sea más significativa la disposición de los restos aminoácidos no polares en la estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas (Singer 1974).

Los terminales hidrofílicos de las proteínas constitutivas, que están expuestos al medio acuoso y cuya conformación nativa determina su actividad enzimática o antigénica, no se unen a detergentes no iónicos. Las porciones hidrofóbicas, embebidas a la membrana, se unen a detergentes no iónicos y la unión hidrófoba no afecta apreciablemente a la actividad. En contraste, los detergentes iónicos, como el SDS, no solo dispersan las proteínas de membrana, sino que las inactivan de forma análoga a como sucede con las proteínas citosolubles (Singer 1974).

Entre los ejemplos de proteínas constituyentes, merecen considerable interés algunas responsables de las actividades enzimáticas consideradas como marcadoras de orgánulos subcelulares del tejido hepático. Tanto la 5'Nucleotidasa (5'N) y la adenilato ciclasa (marcadores de membranas plasmáticas), como la monoamino oxidasa, la succinato citocromo c reductasa y la citocromo oxidasa (marcadores de mitocondrias), o como la glucosa-6-fosfatasa y la NADPH citocromo c reductasa (marcadores del RE y del aparato de Golgi) son consideradas proteínas constituyentes y necesitan un tratamiento con detergente para su liberación de las membranas. La fosfatasa ácida, marcador

de los lisosomas es considerada un enzima citosoluble, que se libera del interior de los lisosomas al tratar éstos con un detergente. Lo mismo ocurre con la glutamato deshidrogenasa que se libera del interior de las mitocondrias. (Nakai et al 1969; Weihing et al 1972; Benedetto et al 1979, Blume 1979)

Dallner y Nilsson (1966) han comprobado en hígado que, las actividades específicas de glucosa - 6 - fosfatasa y NADPH citocromo c reductasa, en el neonato son más elevadas en el RE rugoso que en el liso, mientras ocurre lo contrario con la ATPasa. En el adulto, en cambio, no hay diferencias marcadas entre un tipo de membranas y otras. En estudios realizados en hígado de primate (Erythrocebus patas) adulto y fetal, se ha demostrado que los enzimas marcadores de membranas plasmáticas, mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y microsomas, se encuentran en la fracción nuclear, en la mitocondrial, en la microsomal y, a veces, incluso en la fracción soluble (Benedetto et al 1979). Nakai et al (1969) han discutido el que los enzimas marcadores sean en realidad proteínas estructurales de la fracción considerada. En la fracción de ribosomas o de polisomas, no se pone de manifiesto la presencia de ninguno de estos enzimas (Tata 1972).

En las membranas de cerebro no se han realizado estudios de actividades enzimáticas tan extensas como en hígado. Ello, en principio, es debido a la contaminación de las fracciones. No obstante, es posible además, que el mapa de enzimas marcadores de orgánulos subcelulares en hígado, en músculo y en cerebro difiera en alguna medida. En las fracciones microsomales y submicrosomales de cerebro no se estudia la glucosa - 6 - fosfatasa (Morgan et al 1971, Tamai et al 1974, Kiang et al 1978), considerado como marcador de la fracción microsomal de hígado (Benedetto et al 1979). Exáctamente lo contrario ocurre con la acetilcolinesterasa que se encuentra en microsomas de cerebro

y no se estudia en los de hígado (Tamai et al 1974, Morgan et al 1971, Svensson et al 1972, Tata 1972, Weihing et al 1972, Tangen et al 1973, Kiang et al 1978, Benedetto et al 1979) . Además, los microsomas de cerebro tienen una fuerte actividad Na - K - ATPasa (Tata 1972, Tamai et al 1974) y tampoco carecen de la de NADPH - citocromo c reductasa (Tata 1972). Al comparar las cinco subfracciones microsomales aisladas por Kiang et al (1978), la mayor diferencia encontrada entre ellas es su contenido en RNA mientras que las actividades enzimáticas ensayadas (entre ellas, la NADPH citocromo c reductasa, la Na - K - ATPasa y la acetil colinesterasa varían en un margen no muy amplio.

La 5'Nucleotidasa, enzima del metabolismo purínico, que se ha estudiado en este trabajo, se considera marcador de las membranas plasmáticas (Evans y Gurd 1973; Depierre y Karnovsky 1974b; Brake et al 1978, Benedetto et al 1979). No obstante, también se acusa su presencia en otras fracciones subcelulares como en la nuclear (Reid 1964, Tjernshaugen y Gautvik 1976) y en los microsomas (Song y Bodanski 1967, Widnell y Unkeles 1968, Doss et al 1979). Algunos autores han demostrado incluso que la 5'Nucleotidasa (5'N) es un ectoenzima (Riemer y Widnell 1975, Depierre y Karnovsky 1974 a) aunque Zachowski y Aubry (1977) indican que existe actividad 5'N ligada a la cara interna de la membrana citoplasmática . Por su parte, Stanley et al (1980) presentan evidencia de que existe una relación dinámica entre el enzima intracelular y el localizado en la superficie celular. En trabajos muy recientes , Zachowski et al (1981) demuestran que la 5'N de la membrana plasmática de células tumorales es una proteína constituyente que atraviesa en su totalidad la membrana.

1.2.2

PROTEINAS PERIFERICAS

Aunque Singer discute la existencia de tales proteínas, las define como proteínas que aparecen débilmente unidas a su membrana respectiva y parece que no interaccionan con los lípidos de la membrana (Singer 1974).

Como ejemplos de proteínas periféricas existe el citocromo c, el complejo de la espectrina y la α -lactalbúmina (Singer 1974, Deas et al 1978). El citocromo c, que está unido a dos enzimas relacionados con la función del transporte electrónico, se obtienen libre de lípidos al tratar la membrana mitocondrial interna con KCl 3 M. La espectrina, de la membrana eritrocitaria, es un complejo de cinco subunidades, de las cuales, al menos dos, se separan con EDTA 1 mM. La α -lactalbúmina, antes considerada como proteína citosoluble, es un componente del complejo lactosa sintetasa de la glándula mamaria.

Según Singer (1974) estas tres proteínas están unidas a la membrana respectiva por unión específica con una proteína constituyente particular. La unión específica podría ser análoga a la interacción entre las subunidades α y β de la hemoglobina. Así, estas proteínas periféricas serían como las cabezas polares de las proteínas constituyentes. También de la fracción microsomal de cerebro de buey se ha aislado una proteína de membrana que es capaz de unirse a la calmodulina (Kakiuchi et al 1981). Estas uniones se han comprobado de forma inequívoca en bacterias (Singer 1972, 1974). Las bacterias gram + por tratamientos con lisozima, EDTA o choque osmótico, liberan un 5% de la proteína total en forma de enzimas (5'N, fosfatasa alcalina, ribonucleasa etc.), y de proteínas de unión periplasmática (PBP). Estas PBP son proteínas periféricas que, al parecer, se unen a proteínas constituyentes e intervienen así en el transporte específico de metabolitos a través de las mem-

branas celulares.

Cabe pensar que las proteínas periféricas existen en dos estados y solo se produce la unión en uno de estos estados. Ello estaría en relación con la teoría de Masters (1977, 1978 a y b) de los enzimas "ambicuos" que existen en dos formas en equilibrio, una unida a la membrana y otra no. Así, la fumarato reductasa se libera al tratar con un medio adecuado los esferoplastos preparados a partir de células de Clostridium formicoaceticum; con este medio, la liberación de enzimas citoplasmáticos (enzima málico o acetato quinasa) es mínima (Dorn et al 1978).

Solo con la tabla VI, sin datos estructurales, no se puede distinguir entre una proteína periférica y una proteína contaminante o una proteína constituyente poco embebida en la matriz lipídica de la membrana (Singer 1974).

Incluso un 40% de las proteínas del transporte electrónico se pueden solubilizar de las membranas por tratamiento con agentes caotrópicos como el ion SCN (I) (Hatefi y Hanstein 1969). Toda proteína que interaccione de forma hidrofóbica con la membrana podría ser una proteína constitutiva. Ello incluiría a casi la totalidad de las proteínas citosolubles las cuales poseen manchas hidrofóbicas y son capaces de interaccionar con geles que poseen colas hidrofóbicas (Cuatrecasas y Anfinsen 1971; Hofstee 1973, 1976; Hjerteen 1976).

Son bastantes los trabajos que describen la interacción de enzimas, tradicionalmente considerados como citosolubles, con las membranas de la célula. Numerosos enzimas glucolíticos se aislan asociados, en parte, a estructuras subcelulares; el más estudiado en este sentido es la hexoquinasa que se asocia a la fracción mitocondrial de músculo pectoral de pollo (Sout-hard y Hultin 1972 a y b) y de cerebro de rata (Felgner y Wil-

son 1977), con una elevada afinidad por las membranas microsomal y mitocondrial externa e interna (Spydevold y Borrebaek 1968). La aldolasa se asocia a la fracción membranosa subcelular de hígado (Roodyn 1957) y músculo de rata (Starlinger 1967, Arnold 1968) y músculo de conejo (Arnold y Pette 1968). También la lactato deshidrogenasa (LDH), enzima que se ensaya como marcador de la fracción citosoluble, se aísla asociada a la fracción particulada subcelular de músculo pectoral (Hultin et al 1972, Melnick y Hultin 1973) y de hígado de pollo (Sagristá 1979), de músculo esquelético de anguila (Mattison et al 1972) y de músculo esquelético de conejo (Fernández-Santos 1978). Más concretamente, en hígado de rata se ha descrito que la LDH se localiza en los microsomas contaminantes de la fracción mitocondrial (Brdiczka et al 1973) y en las membranas externa e interna de las mitocondrias (y no en la matriz) (Skilleter y Kun 1970).

La malato deshidrogenasa (MDH) otra deshidrogenasa que como la LDH se ha estudiado en este trabajo, también se asocia a las membranas subcelulares (aun cuando es preponderantemente citosoluble). Se ha demostrado la existencia de este enzima en la fracción submitocondrial "pesada" (membrana interna y restos de matriz) de hígado de rata, mientras que la "ligera" (membrana externa) carece de ella (Sottocassa et al 1967). Análogos resultados se han obtenido con corazón de cerdo (Comte y Gautheron 1978) y con hígado de pollo (Elduque et al 1982). Estos resultados están de acuerdo con la interacción que existe entre la MDH y los lípidos de membrana como la fosfatidilcolina, la cardiolipina y la lecitina (Dodd 1973, Comte y Gautheron 1978).

Otros enzimas citosolubles que se han encontrado en las fracciones membranosas subcelulares, son la adenosina desaminasa (ADA), la guanina aminohidrolasa (GAH) y la purinnucleósido

fosforilasa (PNP), los cuales intervienen en el metabolismo purínico. Así, se halla actividad ADA (y también LDH) asociada a las subfracciones celulares y submitocondriales de cerebro de rata y se observan aumentos de actividad al tratar previamente las fracciones con tritón X-100 (Pull y McIlwain 1974). Lo mismo ocurre con la GAH cuya actividad se encuentra en las fracciones nuclear, mitocondrial "ligera" y "pesada" y microsomal de cerebro de rata, y aumenta al añadir tritón X-100 (Kumar et al 1965). Con la PNP se ha demostrado que está presente en la membrana plasmática y se ha sugerido que actúa como transportador de nucleósidos a través de la membrana, individualmente (Dowd et al 1977) o junto con la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa HGPRT), otro enzima del metabolismo de las purinas (Cohen y Martin 1977).

1.2.3

PROTEINAS DE MEMBRANA RELACIONADAS CON LOS COMPUESTOS PURINICOS. HIPOTESIS DE BURNSTOCK

Otro tipo de proteínas, enzimáticas o no, relacionadas con el metabolismo de las purinas son las que se encuentran como receptores en la superficie celular. La elevada sensibilidad de las membranas celulares de músculo liso y cardíaco frente a los nucleótidos y nucleósidos purínicos fue citada por vez primera en 1929 por Drury y Szent-Gyorgy. Holton (1959) sugirió que el ATP era liberado durante la estimulación antidrómica de los nervios sensores. Se ha propuesto también que la adenosina es un regulador fisiológico del flujo sanguíneo en diversos sistemas vasculares y que interacciona con receptores específicos (Berne 1963, Schrader et al 1977). El ATP además, interacciona con el receptor purínico (P_2) ligado al transporte iónico en células de epitelio renal cultivadas (Simmons 1981). El aporte purínico por parte de la sangre (Lerner y Lowy 1974) ha sido demostrado en células de médula ósea de conejo (Yamada 1961).

En ratas jóvenes existe una elevada incorporación de guanina en las células cerebrales; esta incorporación es mucho mayor que la producida en células de ratas adultas y la guanina incorporada es metabolizada a guanosina y a nucleótidos de guanina (Nakagawa y Gureff 1973). También en linfocitos (Straus et al 1976) y plaquetas (Sixma et al 1976) humanas hay dos sistemas de transporte de adenosina; uno de baja afinidad que permite su fosforilación a AMP y la suposición de una estrecha relación del transportador con la adenosina quinasa asociada a la membrana (Rubio y Berne 1969). Al ser estas proteínas de transporte, o relacionadas con él, deben ser constituyentes, o al menos, deben interaccionar con proteínas constitutivas de las membranas.

Al centrar el estudio de la influencia de los derivados purínicos en el sistema nervioso, Burnstock en 1972 propuso la hipótesis del "nervio purinérgico". Según esta teoría, un nucleótido purínico, probablemente el ATP, es un neurotransmisor. En efecto, en el sistema nervioso autónomo y más concretamente en el tracto gastrointestinal, dicho nucleótido es el principal transmisor liberado de los nervios no-adrenérgicos y no-colinérgicos (Burnstock 1972 a y b; 1973). Desde la formulación de la hipótesis, se han desarrollado un gran número de investigaciones que la apoyan y se sugiere la presencia de nervios purinérgicos en una gran variedad de órganos, como pulmón, tráquea, esófago, ojos y sistema cardiovascular entre otros (Burnstock 1975 a y b; Coleman 1973 a y b).

También existen detractores de la teoría, que se apoyan en la dificultad de obtener pruebas rigurosas que demuestren la hipótesis del nervio purinérgico. Ambache et al (1977 a y b) opinan que a) el ATP está envuelto en una multitud de reacciones bioquímicas celulares entre las cuales está la de actuar asociado a neurotransmisores clásicos; b) el ATP, a veces, pro-

voca la liberación de neurotransmisores de las sinapsis, como lo puede hacer también el ión K (I) o la tiramina, y c) no se han encontrado drogas que bloqueen de forma específica los receptores o que potencien la acción de los transmisores purínicos (Ambache 1980).

Sin embargo, el conocimiento de los nervios purinérgicos es aún escaso en comparación con la gran cantidad de trabajos acumulados sobre los nervios adrenérgicos y colinérgicos. En los tejidos en los cuales se ha demostrado la presencia de nervios purinérgicos, éstos presentan en sus sinapsis vesículas morfológicamente distintas de las de los otros tipos de nervios. Así, aquellos muestran predominantemente "grandes vesículas opacas" (LOV); los colinérgicos presentan "vesículas pequeñas y claras" (AGV) y los adrenérgicos tienen "vesículas granulares" grandes (LGV) y también pequeñas (SGV) (Burnstock 1981 a y b).

Según Burnstock (1972 a y b, 1975 a y b, 1980, 1981 a y b) las pruebas que hacen pensar en que el ATP es el transmisor liberado en los nervios no adrenérgicos, no colinérgicos y predominantemente purinérgicos, son las siguientes: a) la síntesis y el almacenamiento de ATP en los nervios y más concretamente en las LOV; b) la liberación de ATP cuando se estimulan los nervios; c) la actuación del ATP exógeno aplicado que también provoca respuestas post-sinápticas; d) la presencia en las células nerviosas de ATPasa activada por el ión Mg (II), de 5'N y de ADA, enzimas que metabolizan el ATP, y e) la similitud que ejercen algunas drogas tanto frente a la estimulación nerviosa como frente al ATP exógeno añadido.

En el sistema nervioso central (SNC) hay evidencias que apoyan la actuación de los nucleótidos y de los nucleósidos de purina como neurotransmisores o neuromoduladores (Burnstock 1975 b). Tanto si ello se confirma como si no, se ha demostrado la

importancia de tales compuestos dentro de la función del SNC.

Por perfusión de neocortex de cobaya, se ha demostrado la liberación de nucleótidos de adenina y de sus derivados metabólicos, al someter el tejido a estimulación "in vitro" (Pull y McIlwain 1972 a y b, 1973). La adenosina es capaz de regular el flujo sanguíneo cerebral: tal como se ha probado en casos de hipoxia (Berne et al 1974, Rubio et al 1975). Con estos y otros resultados análogos, se ha sugerido un papel neurohumoral para los derivados de adenina en el SNC (Heller y McIlwain 1973, Burnstock 1975 b). No obstante, se ha comprobado últimamente que, la liberación de purinas no está relacionada con la despolarización sino que se produce en el periodo inmediato de post-despolarización y a causa del movimiento de iones asociado (Ca (II) primordialmente) (Hollins et al 1980). También existen casos de liberación de ATP y/o acetilcolina de sinapsis colinérgicas puras (Silinsky 1975, Morel y Meunier 1981). A pesar de ello, las metilxantinas modulan la liberación de purinas, por lo que es posible la existencia en cerebro de receptores específicos para estos compuestos purínicos (Stone et al 1981).

Hace tiempo que se conoce que, la aplicación de adenosina o de ATP a varias regiones del cerebro, produce cambios bioquímicos y electrofisiológicos (Babskii y Malkinan 1950, Galindo et al 1967, Schneour y Hansen 1971). Recíprocamente, al someter a neuronas corticales a estimulación eléctrica, se libera adenosina, la cual causa inhibición profunda de la excitabilidad de la corteza cerebral (Iversen et al 1971). También, el parásito unicelular (Trypanosoma cruzi) que produce la enfermedad de Chaga (con desórdenes neurológicos), no es capaz de sintetizar su propia adenina (Fernández y Castellani 1958) ni de efectuar la síntesis "de novo" de purinas (Gutteridge y Davies 1981), y produce una anomalía estructural de las vesí-

culas grandes (LOV) en los nervios purinérgicos del intestino de los pacientes (Tafuri y Maria 1970).

La importancia de los compuestos purínicos en la función del SNC no se basa de forma única en las evidencias fisiológicas y bioquímicas comentadas. Existen datos que conducen a pensar que los nucleótidos y nucleósidos purínicos tienen un papel esencial en aspectos del comportamiento y en desórdenes psiquiátricos (Burnstock 1975 b). La infusión de AMP_c en el hipotálamo induce sueño físico y electrofisiológico (Marley y Nistico 1972). La inyección de ATP al ventrículo lateral de cerebro de gato, produce debilidad muscular, ataxia y tendencia al sueño. Cornford y Olendorf (1975) han demostrado que existen dos sistemas de transporte de purinas a través de la barrera hematoencefálica, uno para adenina y otro para adenosina, guanosina, inosina y uridina; los autores ven en ello relación con la aciduria orótica, enfermedad hereditaria que provoca un crecimiento y desarrollo retardados.

También los nucleótidos de adenina han sido involucrados en estados depresivos (Hansen 1972, Abdullah y McFarlane 1972, Moyes 1973). En pacientes con estados esquizofrénicos o de depresión psicótica y neurótica, el nivel de ATP y/o de adenosina es elevado en sangre, así como el de AMP_c en orina (Paul et al 1970, Brown et al 1972, Hansen 1972, Hansen y Koudi 1974). También varía el nivel de nucleósidos en cerebro tras la administración de antidepresivos (Halcaak et al 1974).

Aunque queda mucho por investigar para conocer el papel exacto de las purinas en el SNC, dentro del aspecto bioquímico, es preciso seguir estudiando el metabolismo purínico en cerebro. En uno de sus aspectos, conviene investigar la localización y el comportamiento de los enzimas del metabolismo purínico, en fracción soluble y también en sinaptosomas y en vesículas sinápticas; también en microsomas que, en cerebro bovino, con-

tienen parte de las vesículas y membranas sinápticas (Kakiuchi et al 1981). Ello ayudará a comprender ciertos aspectos tales como la captación de adenosina tritiada por ciertas células de corteza cerebral de varios orígenes, que es metabolizada y trasladada, por flujo axónico, hasta los terminales nerviosos donde se liberan inosina e hipoxantina (Trams y Lauter 1975, Schubert y Kreutzberg 1975). También es necesario comprender cómo el aumento del nivel de hipoxantina e inosina, a expensas del de adenosina en casos de isquemia cerebral, se traduce en cambios electrofisiológicos en dicho tejido (Kleihues et al 1974). Recientemente se ha demostrado que tanto la inosina como la hipoxantina se unen al receptor de la droga benzodiazepina (relajante, hipnótica y antoconvulsiva), con una afinidad mayor en cerebro que en tejidos periféricos (Asano y Spector 1979). Es de destacar además el hecho de que la carencia genética de hipoxantin-guanin fosforribosiltransferasa, produce el síndrome de Lesch-Nyham, con retraso mental, automutilación y muerte temprana (Lesch y Nyham 1964, Seegmiller et al 1967).

Existen evidencias de que enzimas tales como la adenosina desaminasa, que se encuentran en la fracción soluble de prácticamente todos los tejidos, y también en cerebro, tenga otra localización subcelular más concreta. En células cerebrales en cultivo, de varios orígenes, se ha encontrado para la ADA una localización subcelular paralela a la de la 5'N que es un enzima marcador de la membrana plasmática (Trams y Lauter 1975). Una localización subcelular más concreta de estos enzimas podría explicar su probable acción de catabolizar los posibles neuroreguladores purínicos (Burnstock 1981 a y b). Tanto la Mg-Ca ATPasa como la 5'N son ectoenzimas que se encuentran en la superficie de gran variedad de células eucariotas. Trams y Lauter (1975) no descartan una análoga localización para la ADA, la cual no ha podido ser demostrada inequívocamente.

1.3

EL METABOLISMO DE LAS PURINAS EN CEREBRO

Las bases púricas, en el hombre, en los primates superiores, en las aves, en los reptiles y en los insectos, son excretados en forma de ácido úrico, mientras que en otros seres de diferente evolución, lo son como alantoina, urea o amoníaco. Estas bases púricas provienen de la degradación de los nucleótidos constituyentes de los ácidos nucleicos y de otros nucleótidos y nucleósidos purínicos celulares que están en continuo recambio (Hershko et al 1967). Sin embargo, no todas las bases púricas son degradadas y excretadas ya que existen las rutas llamadas de recuperación que las reutilizan para incorporarlas a los nucleótidos y nucleósidos (figura 4).

No obstante, no todas las bases púricas presentes en los ácidos nucleicos, nucleótidos y nucleósidos proceden de la reutilización de purinas, ya que existe la síntesis "de novo" de nucleótidos a partir de precursores sencillos no purínicos (Lehninger 1978). Con ello, se alcanza en estado "quasi estacionario" característico de los sistemas vivos en sus estadios de madurez ya que existe un cierto equilibrio entre la cantidad de bases púricas excretadas y las sintetizadas "de novo" (figura 4).

Sin embargo, en el cerebro, donde la síntesis "de novo" es mucho menor que en el hígado (Howard et al 1970, Wong y Henderson 1972), o en eritrocitos donde es nula (Agarwal et al 1976), la ruta de recuperación tiene mucha importancia, aunque el conocimiento actual de alguno de los enzimas que intervienen en el metabolismo general de las purinas (degradación ligada a la vía de recuperación) así como de ciertas funciones que desarrollan, es muy escaso. El hecho de que las bases púricas puedan ser utilizadas para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos ha sido comprobado con compuestos marcados que sirven de

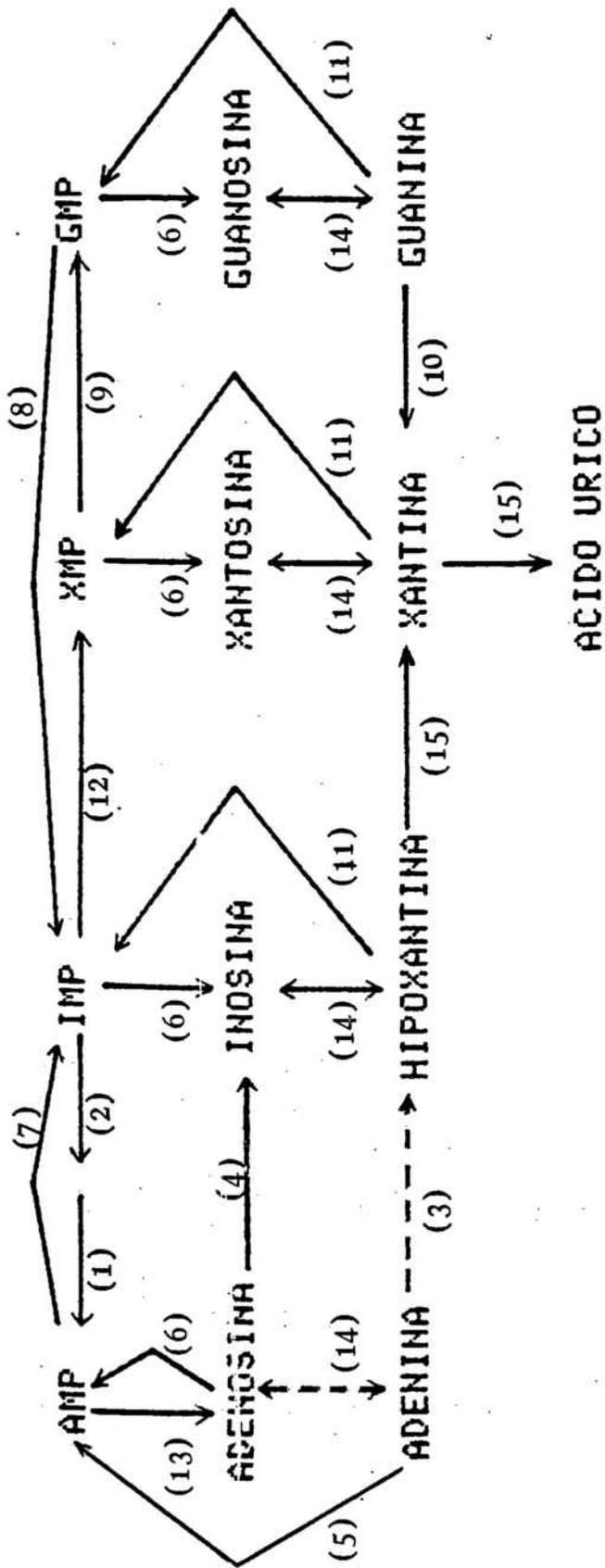


FIGURA 4 .- ESQUEMA DEL METABOLISMO PURINICO

- (1) Adenilsuccinasa E.C.4.3.2.2
- (2) Adenilsuccinato sintetasa E.C.6.3.4.3
- (3) Adenina desaminasa E.C. 3.5.4.2
- (4) Adenosina desaminasa E.C.3.5.4.4 (ADA)
- (5) Adenosina fosforribosiltransferasa E.C.2.4.2.7 (APRT)
- (6) Adenosina quinasa E.C. 2.7.2.1
- (7) AMP desaminasa E.C. 3.5.4.6
- (8) GMP reductasa E.C. 1.6.6.8
- (9) GMP sintetasa E.C. 6.3.4.1
- (10) Guanina aminohidrolasa E.C.3.5.4.3 (GAH)
- (11) Hipoxantin-guanin fosforribosiltransferasa E.C. 2.4.2.8 (HGPRT)
- (12) IMP deshidrogenasa E.C. 1.2.1.14
- (13) 5'Nucleotidasa E.C. 3.1.3.5 (5'N)
- (14) Purinnucleósido fosforilasa E.C. 2.1.2.4 (PNP)
- (15) Xantina oxidasa E.C. 1.2.3.2 (XO)

trazadores. Así, se ha demostrado la incorporación de la ^{15}N -adenina a los ácidos nucleicos (Brown et al 1948). Por otra parte, existen pruebas claras que evidencian esta vía de "recuperación". Así, por ejemplo, hay microorganismos que requieren una o más bases púricas para su crecimiento (Magasanik 1962) y el desarrollo de los carcinomas solo se inhibe parcialmente después de un tratamiento con fármacos que inhiben totalmente la síntesis "de novo" de los nucleótidos purínicos. Sin embargo, la importancia de la reutilización de las bases púricas depende del tipo de célula, lo que sugiere que el nivel, tanto de nucleótidos, nucleósidos y bases púricas pudiera tener distinta significación "in vivo" dependiendo de la especialización y del tipo de función que desempeñe la célula (Schrader et al 1977).

Por la vía de "recuperación", las bases púricas son convertidas en ribonucleótidos vía fosforribosiltransferasa, con el grupo ribosa que da el 5'-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP). Los enzimas aislados que catalizan estas reacciones son la adenin fosforribosiltransferasa (APRT) y la hipoxantín-guanín fosforribosiltransferasa (HGPRT); la primera incorpora la adenina y la HGPRT la hipoxantina y la guanina.

Las bases púricas hipoxantina y guanina, proceden de la degradación e interconversión de nucleótidos y nucleósidos. Sin embargo, el origen de la adenina es desconocido y se cree que su procedencia es de origen exogénico (Murray 1971), si bien no se encuentra en cantidades apreciables en suero (Smith et al 1977), aunque se ha podido obtener "in vitro" por hidrólisis de la adenosina en pequeña cantidad por acción de la purinnucleósido fosforilasa (PNP) muy purificada (Zimmerman y Hiech 1970).

Un segundo tipo de reacciones recuperadoras, está catalizada

por la PNP mediante su actividad transferásica que requiere ribosa-1-fosfato (R-1-P) para transformar la guanina y la hipoxantina en los correspondientes nucleósidos. Este enzima cataliza la reacción reversible de hidrólisis de los nucleósidos guanosina e inosina a las correspondientes bases púricas libres (Barker y Gillam 1960, Friedkin y Kalckar 1961, Gardner y Kornberg 1967, Kim et al 1968 a, Agarwal et al 1969, Murakami et al 1971).

Pero las citadas vías de recuperación, tienen muy poca actividad "in vitro" comparadas con las que representan los enzimas degradativos que, por una serie de transformaciones, conducen a los nucleótidos y a los nucleósidos, a la hipoxantina y la xantina, las cuales dan lugar a la formación de ácido úrico por acción de la xantina oxidasa (XO) en la mayor parte de los tejidos. Sin embargo, en cerebro, la actividad de este enzima es prácticamente nula si bien algunos autores y por métodos muy sensibles, fluorimétricos, han indicado que existe una pequeña cantidad en cerebro de rata (Markley et al 1973). Con ello, el producto final de la degradación en cerebro no es el ácido úrico, sino la xantina y la hipoxantina, siendo, al menos esta última, susceptible de ser recuperada vía HGPRT.

Esto conduce a pensar en la existencia de interacciones profundas que dependen de la función característica del tejido. De un lado, la poca o nula actividad XO en cerebro, hace pensar en una mayor recuperación de purinas que es lógica al ser muy deficiente la síntesis "de novo" en este órgano (Howard et al 1970). Por otro lado, también se sugiere la posible toxicidad del ácido úrico para el tejido nervioso en general o el cerebro en particular. Por último, se debe considerar el papel purinopoyético del hígado (Lerner y Lowi 1974, Pritchard et al 1975), confirmado en médula ósea de conejo (Yamada 1961) y que aporta vía sangre nucleótidos, nucleósidos y bases púricas

a diversos tejidos paliando así el efecto de una alta degradación frente a una pequeña recuperación y casi nula síntesis "de novo" en algunos tejidos, incluido el cerebro.

Por otra parte, pudiera muy bien suceder que las rutas de degradativas se hallasen de alguna forma reguladas, siendo su actividad "in vitro" superior a la que exhiben "in vivo". Así, tanto la guanina como la hipoxantina proceden de la degradación de los nucleótidos y al considerar la degradación de estos "in vivo" hallamos, en primer lugar, el IMP como eje central de la síntesis "de novo" de las purinas (figura 4). Este puede, o bien degradarse a inosina por acción de la 5'N, o bien transformarse en AMP o en GMP; los cuales podrían incorporarse a los ácidos nucleicos o a otros nucleótidos relacionados (ATP o GTP, por ejemplo), o degradarse, asimismo por acción de la 5'N, transformándose en adenosina y guanosina respectivamente. A su vez, la adenosina, puede fosforilarse a AMP por acción de una quinasa muy específica (Smith et al 1977, Agarwal et al 1976) o bien, degradarse (con la misma velocidad "in vitro" en hepatocitos de rata (Smith et al 1977)) por acción de la adenosina desaminasa, transformándose en inosina. Posteriormente, los nucleósidos formados (guanosina e inosina), pueden ser convertidos en las bases púricas libres (guanina e hipoxantina, respectivamente) por acción de la PNP, y finalmente, la guanina puede ser transformada en xantina por la GAH. Si no hay xantina oxidasa, la vía degradativa concluye aquí y no se produce ácido úrico.

Así pues, la vía degradativa es intrincada y compleja pudiendo estar sometida a regulación de todo tipo en cada uno de los enzimas implicados.

En los mamíferos, en experimentos realizados "in vitro", prevalece la transformación a xantina, y es el cerebro el órgano que presenta una actividad más alta de GAH (Kumar et al 1967,

1970, 1972), lo que sugiere que la xantina, y también la hipoxantina no recuperada, son evacuadas del cerebro por el torrente sanguíneo tras superar la barrera hematoencefálica. A un posible nivel elevado de xantina en el cerebro no se le ha podido asignar un papel fisiológico y cabe esperar que la desaminación de la guanina esté sujeta a una regulación intracelular muy concreta en el cerebro.

Como todas estas vías han sido estudiadas "in vitro" y con enzimas parcialmente purificados, cabe pensar en la posibilidad de extrapolación de los resultados al sistema "in vivo". Henderson et al (1977) hicieron un estudio "in vivo" sobre el comportamiento de los enzimas del metabolismo purínico trabajando con células intactas y hallaron casos en los que la extrapolación de los resultados obtenidos en homogeneizados concuerdan con los obtenidos en células intactas, mientras que en otros muchos casos hallaron resultados discrepantes.

Al extrapolar los resultados de los enzimas estudiados "in vitro" al comportamiento de los enzimas en células intactas, se han de tener en cuenta todas las posibles desigualdades entre los sistemas "in vivo" e "in vitro", como pueden ser:

- (a) Vías metabólicas interrelacionadas
- (b) Actividades intracelulares de los enzimas
- (c) Regulación enzimática tanto a nivel metabólico como genético
- (d) Concentraciones intracelulares de metabolitos.

Los mismos autores sugieren (Henderson et al 1977) que el esquema de la figura 4 tiene limitaciones y que, aun cuando es correcto no es completo; ya que se omiten las vías de síntesis y el catabolismo de los coenzimas nucleotídicos, y también hay procesos que pueden ser catalizados por más de un enzima, dando lugar a nuevas vías del metabolismo de purinas.

Se conocen muchos casos en los que se manifiesta la importancia de las vías alternativas del catabolismo de los substratos tanto en células intactas como en incubación "in vitro". Así, se puede demostrar la actividad de la HGPRT en extractos de cerebro de ratón con altas concentraciones de guanina y de PRPP, pero esta reacción no ha podido ser demostrada en fragmentos de tejido de cerebro de ratón incubados "in vitro" (Wong y Henderson 1972). También "in vitro", la guanina es desaminada tan rápidamente a xantina por la GAH que casi no permite recuperar la guanina a GMP por la HGPRT.

Igual ocurre para la síntesis de nucleótidos a partir de la hipoxantina en células que tienen apreciable actividad XO; y para la adenosina en células en las que haya gran actividad ADA. Se han hecho estudios para comparar la velocidad de formación de nucleótidos a partir de precursores purínicos radioactivos en células intactas (Smith et al 1977), pero es enormemente complicado debido a las diferentes alternativas que hay por el substrato marcado dentro del metabolismo purínico.

También las concentraciones intracelulares del substrato pueden limitar la actividad de los enzimas. Tal es el caso de la formación de nucleótidos por la APRT y la HGPRT en células intactas, ya que la velocidad de síntesis es solo el 22% de la actividad total encontrada en homogeneizados (Henderson et al 1975 a). Esta diferencia puede ser debida además de a las bajas concentraciones de adenina, guanina e hipoxantina, a la limitación del PRPP asequible, dado que este se encuentra en muy baja concentración en las células y que su síntesis está regulada por la concentración de fosfato extracelular.

La diferente actividad que muestran los enzimas en extractos y en células intactas también puede ser debida a la alternativa de que los substratos sean utilizados en la ruta anabó-

lica o en la catabólica, con atención especial a la reacción reversible que cataliza la PNP. La localización intracelular de los enzimas y de los substratos, la presencia de inhibidores o activadores, el medio iónico y el entorno hidrofóbico son factores a tener en cuenta.

A pesar de todo ello, hay evidencia de que algunos enzimas tienen actividades análogas en las células intactas y en los homogeneizados (Henderson et al 1975 b). También se han formulado muchas hipótesis sobre el papel regulador que juegan estos enzimas en las células intactas y, en algunos casos, se ha demostrado (Bagnara et al 1974).

Con estas y otras evidencias, como las deficiencias ligadas a la carencia de tipo genético de alguno de estos enzimas (Howard et al 1970), la inmunodeficiencia por carencia de ADA, o PNP o 5'N (Ackeret et al 1976, Siegenbeek et al 1976 a y b, Van der Weyden y Kelley 1976, Van der Weyden et al 1976, Burrige et al 1977, Carson et al 1977, Dinescu-Romalo et al 1977, Hirschorn y Sela 1977, Edwards et al 1978 a y b, Gadjus et al 1978), el distinto nivel enzimático según el tejido en estudio; la modificación de este nivel durante el desarrollo (Kluge et al 1974), en las transformaciones neoplásicas (Formeister y Tritsch 1976, Dinescu-Romalo et al 1977) en la diabetes (Israelson y Tengrup 1980), y dependiendo de la dieta (Lee et al 1973; Kumar, Sitaramaya y Krishnan 1970, Pandá et al 1962, Sitaramaya et al 1974, Kizaki y Sakurada 1977), hace pensar en una regulación a nivel genético, tanto de síntesis de proteínas como de represión y des-represión de los genes que codifican estos enzimas (Hitchings y Falco 1944, Scazzochio y Darlington 1968, Howard et al 1970, Ackeret et al 1976, Formeister et al 1976, Edwards et al 1978, Gadjus et al 1978).

Los enzimas que se han estudiado en este trabajo, relacionados con el catabolismo de las purinas, han sido, la ADA, la

GAH, la 5'N y la PNP.

La adenosina desaminasa (ADA, figura 4) se halla ampliamente difundida en la naturaleza con una función primordial en la degradación de los ácidos nucleicos y de los nucleótidos de adenina. Así, en eritrocitos, al incubarlos con adenosina, se obtienen fundamentalmente, NH_3 e IMP, mientras que la misma incubación, con inhibidores de la ADA, permite la incorporación de la adenosina al acervo de los nucleótidos de adenina. No obstante, su función no es la misma en todos los tejidos ya que se ha demostrado que la extensión de la inhibición "in vivo" por 2'-desoxicoformicina (análogo de la adenosina), es dependiente del tejido (Tedde et al 1979).

La ADA se encuentra en prácticamente todos los tejidos animales (Giusti 1974, Adams y Harkness 1976, Van der Weyden y Kelley 1976) tanto de mamíferos (Brady y O'Connell 1962, Osborne y Spencer 1973, Cartier y Hamet 1976, Chang y Glatzko 1976, Siegenbeek et al 1976, Carson et al 1977, Daddona y Kelley 1977, Fonoll 1981), aves (Hoagland y Fischer 1967), anfibios (Ma y Fischer 1968) o incluso moluscos (Aikawa 1959, 1966; Umemori-Aikawa y Aikawa 1974; Aikawa et al 1977, Aikawa y Aikawa 1981). Si bien se halla fundamentalmente en la fracción soluble, su presencia en otras fracciones subcelulares se ha discutido. Jordan et al (1959) localizan la actividad ADA en la fracción soluble de cerebro de ratón y de roedores y encuentran que, el 65,3% de la actividad en cerebro de conejo está en la fracción soluble y el 32,2% en el residuo de células rotas (núcleos, mitocondrias y microsomas); en las mitocondrias se localiza el 9,5% y el 10,1 en la fracción nuclear. Mustafa y Tewari (1970), han indicado la existencia de una actividad latente en la fracción mitocondrial de cerebro de ratón y que se pone de manifiesto al tratar con tritón X-100. Por centrifugación diferencial localizan el 96% de la actividad total en la fracción so-

luble, con una distribución muy parecida a la de la GAH. Sin embargo, Pull y McIlwain (1974) sitúan la actividad ADA que Mustafa y Tewari (1970) encuentran en la fracción mitocondrial, en los sinaptosomas que se aíslan con la fracción mitocondrial bruta. Van der Weyden y Kelley (1976) han encontrado actividad ADA asociada a las membranas microsomales en tejidos de procedencia humana. Por su parte, Polyakowa y Malisheva (1961), localizan la actividad ADA en la fracción soluble de cerebro de conejo, si bien hay más en la materia blanca, seguida de la médula espinal, cerebelo, materia gris y nervio ciático.

Ya se ha señalado el importante papel de los nucleótidos de adenina y de la adenosina ; por ello, fisiológicamente, la ADA es especialmente importante en este tejido. Así, en casos de deficiencia de ADA se produce una sobreexcitación nerviosa (Burnstock 1975 b). También el papel de la ADA merece ser destacado en el metabolismo de los elementos formes de la sangre, ya que su deficiencia, en el hombre, provoca inmunodeficiencia ; sin embargo, no se ha establecido de forma inequívoca que, la adenosina o la desoxiadenosina, por sí mismas, sean tóxicas para los linfoblastos o para los linfocitos (Benke y Dittmar 1976, Carson et al 1976, Dinescu-Romalo et al 1977, Lapi y Cohen 1977, Lillie y Cohen 1977 , Hersfield et al 1977, Hersfield y Kredich 1978, Grunwald et al 1978, Snyder et al 1978, Worthmann et al 1979, Thuillier et al 1981). Mills et al (1981) han descrito la ausencia de ADA eritrocitaria no ligada a inmunodeficiencia. También existen casos de una superproducción excesiva de ADA con síndrome de anemia hemolítica. La enfermedad es hereditaria y la hemólisis puede ser debida a una incapacidad en la reutilización adecuada de los nucleótidos de adenina, de la cual, los eritrocitos, incapaces de la síntesis "de novo", son muy dependientes (Valentine et al 1977).

La guanina aminohidrolasa (GAH, figura 4) se halla ampliamente distribuida en la naturaleza y se encuentra en bacterias (Rabinowitz y Barker 1956), invertebrados (Davies 1959), peces (Roy 1966) y mamíferos (Schmidt 1935, Galilea 1981). En los mamíferos, la actividad se halla prácticamente en todos los órganos (Lamirande et al 1958, Bendich 1955), aunque es en cerebro donde se halla en mayor proporción. Así, Talwar (1961) demostró que, en rata, la actividad de este tejido es dos veces superior a la de hígado y muy superior a la de otros órganos. Sin embargo, en cerebro de cobaya y de conejo, la actividad no es comparativamente tan elevada como en rata y en ratón (Vilella 1971, Audy et al 1969).

Kumar et al (1965, 1966, 1967 y 1972) encuentran que la mayor cantidad de actividad GAH se halla en la fracción soluble de cerebro de rata, pero que también está presente en la fracción particulada, siendo la fracción mitocondrial ligera especialmente rica. Además, en la fracción mitocondrial pesada, se halla una proteína adicional que actúa de inhibidor natural del enzima de la fracción soluble y no del mitocondrial (Ali et al 1974). Se ha indicado que, en la fracción soluble de cerebro de rata, se encuentran dos formas del enzima, A y B, que se pueden separar por cromatografía en DEAE - celulosa (Kumar et al 1972). Estudios cinéticos, inmunoquímicos y electroforéticos, revelan que el enzima mitocondrial es análogo a la forma A citosoluble (Neu y Winshell 1970).

Debido al activo recambio de los nucleótidos y nucleósidos de guanina (Mansoor et al 1963, Josan y Krishnan 1968, Sitarayama et al 1974) así como a que el ^{32}P se incorpora más a nucleótidos de guanina que a ATP en cerebro de rata estimulado eléctricamente (Mansoor et al 1963), la GAH debe ser un enzima regulador del nivel de estos nucleótidos y nucleósidos de guanina. Josan y Krishnan (1968) han asignado al isoenzima B de

hígado de rata y al A de cerebro de ratón un papel catabólico al estar regulados por GTP o alantoina. Por el contrario, el isoenzima A de hígado de rata y el B de cerebro de rata y de ratón, pueden ser biosintéticos y producir xantina de manera regulada (Krishnan y Kumar 1973). Existen casos de xantínuria en los que parece que el inhibidor mitocondrial del enzima juega un papel principal, y Kumar (1970) postula que su ausencia total o parcial puede hacer que la xantina oxidasa no pueda convertir toda la xantina, procedente de la actividad GAH, en ácido úrico. Hay evidencia de una posible relación entre la deficiencia o ausencia del inhibidor mitocondrial en cerebro humano, con un acusado retraso mental e incluso muerte (Kumar y Rathi 1976). Por último, cabe destacar que, en los tejidos de cerdo, la mayor actividad GAH se encuentra en cerebro, mientras que está ausente en hígado, riñón, bazo, corazón y sangre (Rossi et al 1978, Carpenne et al 1976). Una deficiencia del enzima, que provoca síntomas de gota por acumulación de guanina en las articulaciones, puede ayudar al mayor esclarecimiento de su papel fisiológico (Bendich 1955).

La 5'Nucleotidasa (5'N, figura 4) es específica para 5'ribonucleótidos y 5'desoxiribonucleótidos monofosfato de purina. Su actuación se centra en el primer eslabón del catabolismo de los mononucleótidos procedentes de los ácidos nucleicos o de los restantes nucleótidos, hacia la producción de ácido úrico. A su actuación ayudan dos fosfatasas inespecíficas que también pueden desfosforilar los mononucleótidos: la ácida y la alcalina (Hasunuma e Ishikawa 1977, Tjernshaugen 1978). En tejido hepático de rata también existe un enzima con actividad 3' y 5' Nucleotidasa tanto para ribo como para desoxiribonucleótidos, si bien es mucho menos específico para los 5'ribonucleótidos (Tjernshaugen y Fritzson 1976).

La 5'N se halla ampliamente difundida en todas las especies animales, desde microorganismos (Dvorak y Heppel 1968, Hasunuma y Ishikawa 1977, Holy y Plsek 1976) hasta en el hombre (Song y Bodanski 1966), pasando por toro (Bodanski y Schwartz 1963, Levin y Bodanski 1966), pollo (Itoh et al 1967, 1978; Naito y Tsushima 1976), rata (Fritzson 1968, 1969; Fleit et al 1975; Riemer y Widnell 1975; Carraway et al 1976, Nakamura 1976; Van der Berghe et al 1977; Tjernshaugen 1978), ratón (Surrán 1973), cerdo (Burger y Lowenstein 1970, 1975; Dornand et al 1977), buey (Losowsky 1966, Mallol 1981), cordero (Ipata 1967) y otras especies (Zachowsky et al 1977 a y b).

Se ha demostrado su amplia distribución en todos los tejidos de una misma especie. En tejidos humanos, los más ricos en 5'N son el tiroides, las paredes de la aorta, el testículo y el cerebro (Reis 1950, 1951). En los diferentes tejidos de rata, el bazo es el que exhibe la máxima actividad específica, que es muy alta en timo y en la mucosa del intestino delgado, y es notable en médula ósea, páncreas, riñón, testículo, pulmón e hígado. En cerebro y en corazón, la actividad es algo menor (Tjernshaugen y Fritzson 1976). No se ha detectado actividad 5'N en suero de rata (loc cit).

Su distribución intracelular depende del medio usado en la homogeneización. Si ésta se hace con detergentes, se obtiene evidencia de la existencia de mayor actividad 5'N no encontrada al utilizar los métodos corrientes (sacarosa isotónica) en hígado de rata y pollo (Tjernshaugen y Gautvik 1976, Tjernshaugen y Fritzson 1976, Itoh et al 1978, Naito y Tsushima 1976). Ello es debido a que la 5'N se considera un enzima de membrana que es marcador de la membrana plasmática (Evans y Gurd 1973, Depierre y Karnovsky 1975 a y b, Brake et al 1978). También se acusa su presencia en otras fracciones subcelulares como en los núcleos (Reid et al 1964, Tjernshaugen y Fritzson 1976) y los

microsomias (Song y Bodanski 1967, Widnell y Unkeless 1968, Doss et al 1979), aunque se ha estudiado sobre todo en la fracción soluble citoplasmática (Fritzson 1968, Naito y Tsushima 1976, Van der Berghe et al 1977, Itoh et al 1978). En cultivos celulares de Bacillus subtilis K, la actividad 5'N aparece tanto en la fracción citoplasmática como en la membrana plasmática y en la pared celular, así como en el medio extracelular (Shiio y Ozaki 1978). Algunos autores han demostrado que la 5'N es un ectoenzima (Castellino y Barker 1968, Riemer y Widnell 1975); sin embargo, Zachowski y Aubry (1977) indican que existe actividad 5'N ligada a la cara interna de la membrana citoplasmática. Por su parte, Stanley et al (1980) presentan evidencia de que existe una relación dinámica entre el enzima intracelular y el localizado en la superficie celular. Recientemente, por técnicas inmunoquímicas, se ha demostrado que la 5'N es una proteína que atraviesa la membrana; además, su cara hidrolítica puede estar orientada hacia el exterior o hacia la cara citoplasmática según la célula (Zachowski et al 1981). Se ha probado también la existencia de un enzima soluble, otro unido a membrana y otro lisosomal en hígado de rata (Naito y Tsushima 1976); así como la existencia de un enzima soluble, otro microsomal, otro ligado al axoplasma (asociado con mielina) y otro en la membrana plasmática de cerebro de ratón (Suran 1973). Pechan (1970), en cerebro de cobaya encuentra actividad 5'N en todas las subfracciones celulares, especialmente en los sinaptosomas, aunque la mayor actividad específica se halla en la fracción de mielina.

La actividad de la 5'N, enzima de la primera etapa del catabolismo purínico (figura 4), parece que está relacionada con la velocidad de recambio de los ácidos nucleicos, o sea, con la vida media de la célula mas que con su actividad (Tjernshaugen y Fritzson 1976). Por otra parte, la 5'N está más regu-

lada que la ADA y es inhibida por trinucleótidos, principalmente por ATP (Ipata 1967, 1968; Murray y Friedrichs 1969; Fox y Marchant 1976). Esta inhibición incide en el metabolismo de las purinas y los ácidos nucleicos, pero también en la síntesis de coenzimas (Murray y Friedrichs 1969, Fritzon 1978).

Como es un enzima que se encuentra en la membrana plasmática, a veces su actuación es acorde con su localización. Así, en casos de anoxia, con disminución de ATP, la 5'N de la superficie de los miocitos coronarios, se desinhibe y produce mayor cantidad de adenosina, la cual produce una vasodilatación que contrarresta el efecto (Burger y Lowenstein 1970, 1975, Fox y Marchant 1976, Frick y Lowenstein 1976, Heyliger et al 1981, Saito et al 1981). En linfocitos, se ha establecido que la 5'N es un ectoenzima que regula la entrada de AMP en los mismos, al transformar este metabolito en adenosina, que es la que se incorpora (Fleit et al 1975, Dornand et al 1979). En adipocitos de rata se ha demostrado que la adenosina puede regular la captación de P_i (Ohisalo y Stouffer 1981) y tanto en estas células (Newbi et al 1975) como en la superficie externa de las células musculares (Woo y Manery 1975) se degradan mononucleótidos por acción de la 5'N. En cerebro también se ha demostrado que la 5'N es un ectoenzima (Trams y Lauter 1975) y se ha sugerido que el enzima, en los nervios purinérgicos, desempeñe un papel de inactivación parecido al de la colinesterasa en los nervios colinérgicos (Burnstock 1972, 1981 a y b).

Su deficiencia en los linfocitos, ligada al cromosoma X, produce agammaglobulinemia (Edwards et al 1978 a y b) y también su actividad está muy disminuida en las leucemias y en las mononucleosis infecciosas (loc cit). También su carencia o su disminución de actividad en los eritrocitos está relacio-

nada con la anemia hemolítica hereditaria (Valentine et al 1974, Harley et al 1978, Buc et al 1979, Shinohara y Tanaka 1979), o la adquirida por intoxicación por plomo (Valentine et al 1976). Su ausencia acarrea la acumulación de nucleótidos en los eritrocitos (Paglia y Valentine 1975).

La purinnucleósido fosforilasa (PNP, figura 4) es bastante específica para guanosina e inosina, aunque también puede reaccionar con los restantes ribo y desoxirribonucleósidos de purina (Friedkin y Kalckar 1961, Gardner y Kornberg 1967, Kim et al 1968 a, Agarwal y Parks 1969). Así, la PNP puede servir para recuperar R-1-P o dR-1-P. El R-1-P se puede convertir en R-5-P, que puede ser usado en las demandas energéticas de la célula o puede reaccionar con el ATP para dar PRPP. El PRPP es un intermediario clave para la biosíntesis de 5'-ribonucleótidos monofosfato y también puede ser utilizado por la HGPRT o la APRT en la vía de recuperación de purinas (Parks y Agarwal 1972).

Aunque las reacciones de transferencia que catalizan enzimas hidrolíticos son irreversibles, la reacción catalizada por la PNP puede actuar en ambos sentidos (figura 4) (Kim et al 1968 b, Krenitsky et al 1968 a).

La PNP se halla ampliamente difundida en la naturaleza, en bacterias (Engelbretch y Sadoff 1969, Imondi et al 1970, Beachan y Pritchard 1971, Murakami 1971, Serra et al 1971, Jensen 1976, 1978; Edwards et al 1978 a), aves (Murakami y Mitsui 1971, Manzanero 1978, Mora 1982) y mamíferos (Barker y Gillam 1960, Yamada 1961, Kishi 1969, Krenitsky et al 1967, 1968 a y b; Lewis y Glantz 1976); se ha estudiado sobre todo en eritrocitos humanos (Kim et al 1968 b; Krenitsky et al 1968 a y b; Sheen et al 1968; Pinto 1970; Agarwal y Parks 1971; Ramachandran e Iver 1976, Siegenbeek et al 1976).

La actividad de la PNP varía según el tejido y en rata, la mayor actividad la presenta el hígado, mientras que en cerebro no se ha ensayado comparativamente la actividad, y en corazón es nula (Kishi 1969, Imondi et al 1970). Sin embargo, Stern (1952) encuentra una elevada actividad del enzima en músculo cardíaco de buey .

En rata, en todos los tejidos estudiados, el enzima está en la fracción soluble y nunca en la nuclear (Kishi 1969).

En Bacillus cereus se encuentran dos PNP diferentes, una en la célula vegetativa y otra en la spora (Gardner y Kornberg 1967, Gilpin y Sadoff 1971). En Bacillus subtilis existen dos enzimas distintos; una PNP específica para guanina e hipoxantina y una adenosin fosforilasa específica para adenosina . Hay evidencia de que, en células humanas debiera existir este segundo enzima, pero no se ha encontrado adenosin fosforilasa en organismos superiores (Jensen 1978). La PNP, al poder actuar tanto en la vía biosintética como en la catabólica, es esencial para la reutilización de ribo y desoxirribonucleósidos de purina en células donde falta la síntesis "de novo" de nucleótidos purínicos (Glantz y Lewis 1978, Stoeckler et al 1978); éstos pueden obtenerse tanto a partir de los nucleósidos, por acción de quinasas, como de purinas vía HGPRT o APRT (Korn y Buchanan 1955). La formicina A (análogo de la adenosina) inhibe al enzima tanto en homogeneizados como en eritrocitos intactos. Ello apunta al papel de la PNP como regulador del metabolismo desde otro punto de vista, ya que interviene en el transporte mediado a través de membrana (Chao 1976, Sheen et al 1968, Cohen y Martin 1977, Dowd et al 1977, Mura et al 1978). Tanto en polioma como en fibroblastos y eritrocitos humanos, se ha evidenciado la existencia de dos transportes de inosina a través de membrana (Sheen et al 1968, Dowd et al 1977, Parks et al 1981). Solo uno de ellos es mediado y

requiere una fosforilasa específica, o sea, una PNP que, en fibroblastos, es inhibida por exceso de inosina y que actúa ligada a una fosforribosil transferasa que, al incorporar hipoxantina a la célula, es una HGPRT. En conjunto, la inosina extracelular se incorpora al interior de la célula en forma de R-1-P y de IMP, estando el P_i y el PRPP aportados por el medio intracelular (Cohen y Martin 1977).

Su deficiencia, total o parcial, está ligada, como en el caso de la ADA y la 5'N, a inmunodeficiencia (Edwards et al 1978 a y b; Siegenbeek et al 1976 b). Los pacientes tienen una hiperactiva síntesis "de novo", hipouricemia e hipouricosuria, pero niveles elevados de nucleósidos de guanina e hipoxantina en orina y suero (Cohen et al 1976, Siegenbeek et al 1976 a y b, 1977). En casos de déficit parcial (50%), también ligado a inmunodeficiencia, hay una superproducción de purinas y de inosina que se excretan por orina; no hay aciduria orótica y el ácido úrico es normal en orina (Jensen 1978). En casos de gota con niveles normales de hemoglobina, o en pacientes con el síndrome de Lesch-Nyham, la actividad PNP se ve incrementada (Gerbaut et al 1976).

O B J E T O

La hipótesis de la actuación de los compuestos purínicos como neurotransmisores o neuromoduladores y la modificación de los niveles de tales compuestos en diversas condiciones, fisiológicas o no, del sistema nervioso central ponen de relieve el interés acerca del metabolismo de tales compuestos, especialmente en el encéfalo.

En el presente trabajo se ha estudiado el catabolismo purínico en la fracción soluble, en la fracción microsomal y en la fracción de vesículas sinápticas de cerebro de rata, así como en la fracción soluble y microsomal de cerebelo de rata.

Para ello se han establecido las características cinéticas de los enzimas del catabolismo purínico aislados en la fracción soluble de cerebro de rata frente a sus posibles substratos fisiológicos y se han determinado las inhibiciones que experimentan por compuestos intermediarios del metabolismo purínico (fig 4). La comparación de las velocidades de reacción de los enzimas implicados ha permitido formular una hipótesis acerca de las distintas alternativas que se pueden producir en dicho catabolismo.

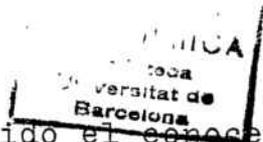
Se han estudiado las actividades ADA, GAH y PNP, así como LDH y MDH ligadas a los microsomas de cerebro de rata, enzimas (fig 4) que se han caracterizado y comparado con las que se obtienen en la fracción soluble. Se ha avanzado en el estudio de los tipos de unión de tales enzimas a la fracción microsomal y se ha emitido una hipótesis acerca de la validez del uso de los microsomas en el estudio del catabolismo purínico y quizás de otros metabolismos.

Se ha demostrado la permanencia de todos los enzimas estudiados aun después de tratamientos sucesivos de los microsomas

con detergentes.

Se ha estudiado la unión de la 5'N a la fracción microsomal y se ha puesto de manifiesto que este enzima y también la ADA muestran un comportamiento distinto al del resto de los enzimas ensayados. Este diferente comportamiento también se ha evidenciado en experimentos realizados con jugos de "expresión" de cerebro de rata, y al estudiar la presencia de los enzimas en la fracción de vesículas sinápticas de este mismo tejido. Para concluir, una vez comprobada la diferente localización de los enzimas del catabolismo purínico en las fracciones subcelulares, se ha establecido que los niveles enzimáticos son distintos, especialmente la GAH, en las fracciones soluble y microsomal de cerebro y cerebelo de rata.

Debido al bajo rendimiento cuantitativo en la liberación de los enzimas del catabolismo purínico de la fracción microsomal de cerebro de rata, se han ensayado medios alternativos de homogeneización de los cerebros de rata, con objeto de aumentar el rendimiento en la obtención de la fracción microsomal. Ello ha sido posible mediante la utilización de medios conteniendo DMSO. Se han realizado experimentos comparativos para establecer posibles diferencias entre los microsomas obtenidos en ausencia o en presencia de DMSO, que han incluido el análisis de enzimas marcadores, además de los del metabolismo purínico. En una extensión de los experimentos comparativos se ha sometido a los microsomas a centrifugación isopícnica en Percoll, filtración en gel de Sepharose CL 4B y enfoque isoeléctrico. En tales estudios, los microsomas, obtenidos en ausencia o en presencia de DMSO, se han comportado como una sola fracción y los resultados han permitido avanzar en el conocimiento de dicha fracción microsomal.



La microscopía electrónica ha permitido el conocer más en detalle los componentes de la fracción microsomal y como se modifican tras los diversos tratamientos; también se han podido comparar, merced a esta técnica, los componentes de los microsomas cuando éstos se obtuvieron en presencia o en ausencia de DMSO.

3

M A T E R I A L E S

3.1

MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico de partida ha sido el tejido cerebral y cerebelar de rata. Los encéfalos fueron obtenidos de ratas recién decapitadas y se separaron de forma sistemática los cerebelos. Las ratas utilizadas han sido de raza Wistar, machos y de 200 - 300 g de peso.

En experimentos realizados con xantina deshidrogenasa (XDH), se ha trabajado con un preparado de tejido hepático de pollo. El tejido utilizado para su obtención procedió de animales recién sacrificados.

3.2

PRODUCTOS

3.2.1

PROTEINAS

Como proteínas estandar, en diversos experimentos y como enzimas acoplados para la medida de diversas actividades enzimáticas, se utilizaron: seroalbúmina (BSA) bovina cristalizada, hemoglobina, ferricitocromo c y ferritina (SIGMA), adenosina desaminasa de intestino de buey (A.E. 200 U/mg proteína), guanina aminohidrolasa de hígado de conejo (A.E. 0,06 U/mg proteína), nucleósido fosforilasa de pulmón de buey (A.E. 25 U/mg proteína) y xantina oxidasa de leche (A.E. 0,4 U/mg proteína) (BOEHRINGER - MANHEIM)

3.2.2

SUBSTRATOS, COFACTORES Y OTROS REACTIVOS

Los substratos y cofactores de los enzimas estudiados y los reactivos usados fueron:

- 6-fosfato de glucosa, 5'-monofosfato de gua-

nina (GMP), inosina, NAD, NADH, NADPH, riboflavina y xantosi-
na (BOEHRINGER - MANHEIM)

- ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (DÖESDER)

- acrilamida y N,N'-metilen bisacrilamida

(EASTMAN KODAK)

- araldita DJRCUPAN ACM, dimetilamino propio-
nitrilo, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED);(FLUKA).

- peróxido de hidrógeno (FORET)

- 5'-monofosfato de xantosina (KOCH-LIGHT)

- acetato de uranilo, adenina, adenosina, 5'-
monofosfato de adenosina (AMP), cocarboxilasa, dimetilsulfó-
xido (DMSO), glicina, glutaraldehído (25%), guanina, guanosina,
hipoxantina, l-histidina, lactato de sodio 50%, ácido d,l-má-
lico, p-nitrofenil fosfato, ácido oxalacético, óxido de propi-
leno, piruvato de sodio, sacarosa, tetróxido de osmio, tris
(hidroximetil) amino metano, Tritón X-100, ácido úrico, xan-
tina (MERCK)

- etanol absoluto, etilenglicol (PROBUS)

- cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT), bro-
muro de 3(4,5-dimethylthiazolyl-2-)2,5-diphenyltetrazolium
(MTT) (SERVA)

- 5'-difosfato de adenosina (ADP), azul de
dextrano, coomasie brilliant blue, Folin-Ciocalteu, 5'-mono-
fosfato de inosina (IMP), cloruro de p-iodo nitrotetrazolium
violet (INT), ácido maléico, metasulfato de fenacina (PMS)
(SIGMA)

- agarosa "IEF", anfolitos 40% margen pH 3-10
y 8-10,5, "Percoll" (PHARMACIA FINE CHEMICALS)

- desoxicolato de sodio, etilendiamino tetra-
acetato de disodio (EDTA) (UCB)

Los sustratos y cofactores de los enzimas fueron, en su
mayoría, de calidad "para fines bioquímicos"; los demás reac-

tivos fueron de calidad "para análisis".

3.3 MATERIAL DE CROMATOGRAFIA, ELECTROFORESIS
ENFOQUE ISOELECTRICO Y CENTRIFUGACION
ISOPICNICA

Los geles utilizados han sido de Sephadex G-25 (preempaquetados en columnas PD-10), Sephadex G-50, DEAE Sepharose CL 4B y Sepharose CL 4B (Pharmacia Fine Chemicals).

El soporte electroforético empleado, aparte de los geles de poliacrilamida, fueron tiras de acetato de celulosa (Cellogel), que se conservaron sumergidas en metanol al 40% antes de su empleo. Las fuentes de corriente continua empleadas en electroforesis, han sido ATOM 500.

En los experimentos de electroenfoque se usaron disoluciones de anfolitos del 40%, de margen de pH 3-10 o de 8-10,5 (Pharmacia Fine Chemicals). Para la preparación de las placas de agarosa, que es el soporte del electroenfoque analítico, se usó "Gelbond film" (Marine Colloids Division). La fuente de corriente continua y de potencia constante que se empleó en tales experimentos fué de Pharmacia Fine Chemicals, modelo ECPS 3000/150. En el llenado y posterior elución de la columna de enfoque isoelectrónico preparafivo, se usaron dos bombas peristálticas Gilson MINIPULS II.

En la formación de gradientes para los experimentos de centrifugación isopícnica, se usaron disoluciones stock de "Per-coll" (Pharmacia Fine Chemicals).

4

M E T O D O S

4.1

PREPARACION DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO
DE RATA PARA LOS ENSAYOS CINETICOS

Los cerebros de las ratas se homogeneizaron en sacarosa 0,25 M (1 g de tejido/6,5 ml de disolución) mediante un homogeneizador de Potter-Elvehjem (B. Braun Mensulgen) a 1.000 rpm, 15 impulsos. La suspensión se centrifugó (18.000xg, 30 min a 4°C). El sobrenadante se ultracentrifugó (rotor 35 FA a 105.000xg, 90 min a 4°C; ultracentrífuga Beckman L-5-75 H). El sobrenadante se dializó (Visking tubing, 16 h a 4°C) frente a 500 volúmenes de tampón tris (34 mM)-HCl, pH 7,4 y, por último, se centrifugó (20.000xg, 15 min a 4°C). La disolución final contuvo $2 \pm 0,1$ mg proteína/ml, así como 0,0080 U/mg proteína de ADA, 0,017 U/mg proteína de 5'N, 0,051 U/mg proteína de GAH y 0,052 U/mg proteína de PNP.

Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato en 1 min a 37°C, bajo las condiciones de trabajo. Los sustratos elegidos han sido la adenosina para la ADA, la guanina para la GAH, la inosina para la PNP y el AMP para la 5'N. La concentración de sustrato fue de 100 μ M en todos los casos.

4.2

OBTENCION DEL PURIFICADO PARCIAL PARA LOS
ENSAYOS CINETICOS

Para alguna de las inhibiciones estudiadas, se ha requerido la separación del enzima en estudio de otros enzimas que transforman el producto inhibidor. La disolución enzimática descrita se sometió a una cromatografía en DEAE-Sepharose CL 4B (véase 4.17.2) equilibrada con tampón tris (34 mM)-HCl de pH 7,4.

La elución se efectuó mediante un gradiente de NaCl entre 0 y 0,3 M en el mismo tampón, con lo que se consiguió la separación de la ADA, la GAH y la PNP (figura 5). Se recogieron las siguientes fracciones: ADA 0,16 mg proteína/ml y 0,14 U/mg, exenta de GAH; 5'N 0,19 mg proteína/ml y 0,076 U/mg; y PNP 0,65 mg proteína/ml y 0,30 U/mg, exenta de GAH y de ADA.

4.3

PREPARACION DE LA FRACCION MICROSOMAL Y
SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA

Los cerebros de las ratas se homogeneizaron en el medio A, que constó de sacarosa 0,28M, tris 25 mM, EDTA 1 mM, ajustado a pH 7,4 con HCl. En los experimentos en los cuales se ha determinado la actividad 5'N, se ha prescindido del EDTA que enmascara de forma prácticamente total dicha actividad.

La relación ml de A/g de tejido, fué de 6,5. En los casos en que esta relación se vió modificada, se hará mención explícita en la parte experimental.

La homogeneización se llevó a cabo mediante un homogeneizador de Potter-Elvehjem (B. Braun Melsungen, entre 95 y 115 μ m de holgura) a 500 rpm, 15 impulsos. La suspensión se centrifugó (12.500xg, 30 min a 4°C) para eliminar las células no rotas, los núcleos, las mitocondrias y los sinaptosomas. El sobrenadante se ultracentrifugó (rotor 35 FA, 105.000xg, 90 min a 4°C, ultracentrífuga Beckman L-5-75 H). El residuo constituyó la fracción microsomal y el sobrenadante, tras pasar por una columna PD 10 (Sephadex G-25, Pharmacia Fine Chemicals), constituyó la fracción soluble en los experimentos de comparación con las actividades enzimáticas ligadas a los microsomas.

Este método de obtención de la fracción microsomal es el propuesto por Schneider y Hogeboom (1950); en él se considera como tal la fracción que precipita a 105.000xg tras la elimi-

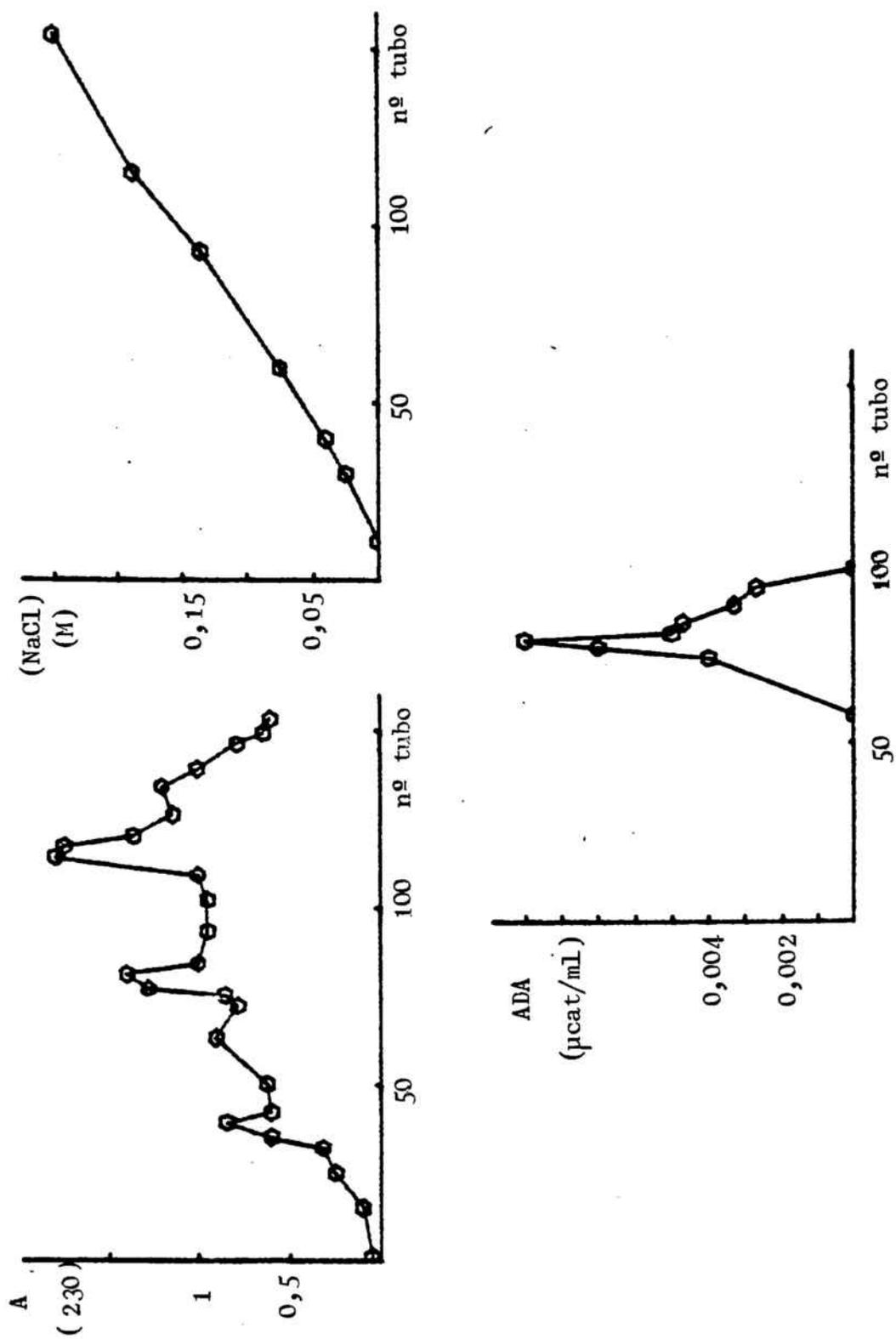


FIGURA 5.- OBTENCION DE UN PURIFICADO PARCIAL DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA POR CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHAROSE (véase 4.2). La cromatografía se realizó con la columna (16 x 260 mm, volumen de lecho 52 ml) equilibrada en tampón tris (34 mM)- HCl de pH 7,4 y con un gradiente de NaCl entre 0 y 0,3 M (700 ml totales). Fracciones de 5,25 ml (Continúa en la página siguiente)

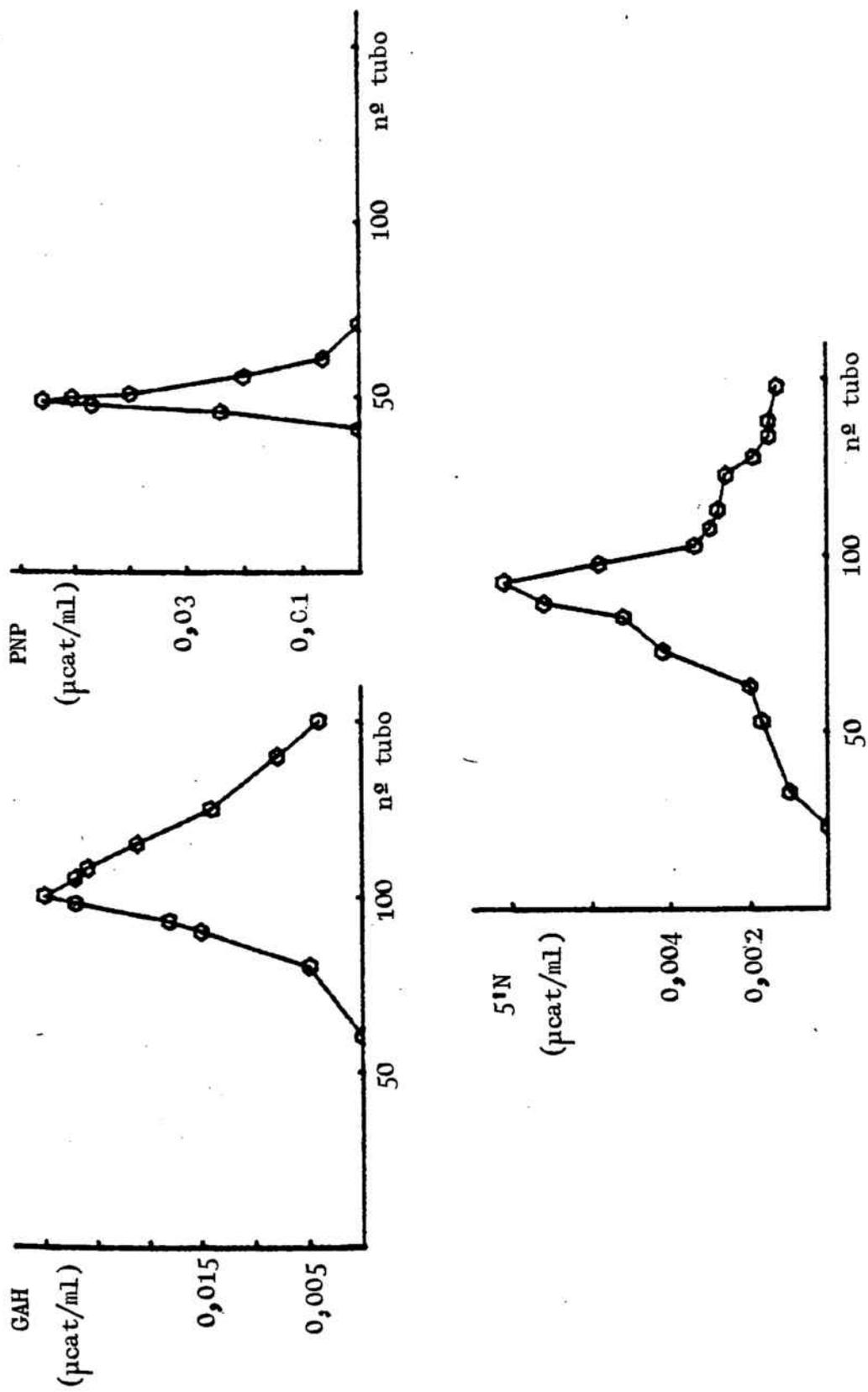


FIGURA 5 (Continuación).-

Actividades ADA, GAH, PNP y 5N. Proteína: Absorbancia a 230 nm. La conductividad de los eluidos se determinó para medir el gradiente de NaCl.

nación de mitocondrias y núcleos de un homogeneizado del tejido correspondiente, en un medio isotónico de sacarosa. Cuando se modifique este método se hará mención explícita en la parte experimental.

4.4 PREPARACION DE LA FRACCION MICROSOMAL Y SOLUBLE DE CEREBELO DE RATA

Las fracciones microsomal y soluble de cerebelo de rata se obtuvieron de la misma manera que cuando se trata de cerebro (Véase 4.3).

4.5 OBTENCION DE LA FRACCION DE VESICULAS SINAPTICAS DE CEREBRO DE RATA

La fracción de vesículas sinápticas de cerebro de rata se ha obtenido por el método de Soller et al (1973) el cual es una modificación del de Whittaker, Michaelson y Kirkland (1964).

Unos 20 g de tejido, consistente en cerebros seccionados en su mitad superior, se homogeneizaron en 10 volúmenes de sacarosa 0,32 M. La suspensión se centrifugó a 1.000xg, 10 min para eliminar las células no rotas y los núcleos. El sobrenadante se centrifugó a 11,500xg, 20 min para precipitar la fracción mitocondrial cruda. Esta última se resuspendió en H₂O (3 ml por g de tejido fresco equivalente) y se mantuvo 15 min a 0-4 °C para romper los sinaptosomas y liberar las vesículas sinápticas. Durante estos 15 min, las partículas se dispersaron con ayuda de un homogeneizador de Potter-Elvehjem, a 500 rpm, 5 impulsos y a intervalos de 5 min. La suspensión se centrifugó a 6,000xg, 15 min y se eliminó el residuo. Del sobrenadante se tomaron tres fracciones de 15 ml y se depositaron cada una sobre 13 ml de sacarosa 0,2 M. El conjunto se centrifugó en un rotor SW 25.1 (ultracentrífuga Beckman L-5-75 H) a 53,000xg,

120 min. La interfase resultante y la capa de sacarosa 0,2 M que estaba por encima (2 mm) del residuo, se recogieron, se diluyeron con un volumen igual de H₂O y el conjunto se centrifugó (105.000xg, 60 min, rotor 35 FA). Con ello se obtuvo un residuo que constituyó la fracción de vesículas sinápticas crudas.

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 0-4 °C.

4.6 OBTENCION DE SUSPENSIONES EN EXPERIMENTOS DE "EXPRESION" DE CEREBROS DE RATA

En los experimentos de "expresión", dos cerebros de rata se sometieron a centrifugación en un rotor 35 FA (ultracentrífuga Beckman L-5-75 H), a 105.000xg y por un espacio de tiempo que se especificará en cada caso.

Tras la ultracentrifugación, el líquido sobrenadante se recogió para ser sometido a determinación de actividades enzimáticas.

Paralelamente se centrifugaron sendas alícuotas de la fracción soluble para determinar el efecto de la ultracentrifugación prolongada en las actividades enzimáticas.

Durante todo el proceso de centrifugación se mantuvo la temperatura de 4°C.

El método aquí descrito está basado en el de Amberson et al (1964).

4.7 PREPARACION DEL EXTRACTO DE TEJIDO HEPATICO DE POLLO

El tejido hepático se homogeneizó en un triturador de cuchillas con tampón de fosfato sódico 0,1 M de pH 7,0 (1 g de te-

jido/1,5 ml de tampón).

La suspensión se centrifugó a 105.000xg, 90 min. El sobrenadante se sometió a una calefacción, 30 min a 56°C. Tras la centrifugación (15.000xg, 30 min) el residuo se descartó y el sobrenadante se llevó a un 35% de saturación de sulfato amónico. La suspensión se centrifugó a 20.000xg, 45 min y se desechó el sobrenadante. El residuo se disolvió en el medio A y se filtró a través de gel de Sephadex G-50 (véase 4.17.1) equilibrado con A, para eliminar las sales. La disolución proteica exenta de sales constituyó el extracto que se utilizó en los ensayos correspondientes.

4.8 MODO DE EFECTUAR LOS LAVADOS DE LAS FRACCIONES PARTICULADAS

Los tratamientos efectuados sobre las fracciones particuladas (microsomos y vesículas sinápticas) han sido en forma de lavados.

Con el medio de lavado adecuado en cada caso, se ha suspendido la correspondiente fracción particulada con ayuda de un homogeneizador de Potter-Elvehjem (500 rpm, 7 impulsos), y en la relación 2 ml del medio de lavado/g tejido original equivalente.

De la suspensión se tomó una alícuota para su análisis enzimático (si hubo lugar) y se centrifugó (105.000xg, 90 min) para volver a precipitar la fracción particulada. El sobrenadante se guardó para su análisis enzimático.

Cuando se precisó, el nuevo residuo se volvió a someter a otro lavado sucesivo en la misma manera que la comentada.

En general, se ha procurado que los medios de lavado fueran isotónicos y todos los lavados se han efectuado a 0-4 °C.

4.9

SONICACION

La fracción particulada, lavada previamente con los medios oportunos, se suspendió en el medio del ensayo de la misma manera en que se efectuaron los lavados. Posteriormente, la sonicación se llevó a cabo con alícuotas no inferiores a 20 ml, sumergidas en un baño a 0-4 °C y en un aparato Kerry Ultrasonics; a 18 micrones y por intervalos de 30 segundos seguidos de períodos de descanso de 30 segundos.

La centrifugación para volver a precipitar la fracción particulada fué idéntica al caso de los lavados (105.000xg, 90 min).

4.10

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se llevaron a cabo en una cuba Acrylophor - 140 (Pleuger)

4.10.1

ELECTROFORESIS ZONAL

Las distintas electroforesis se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida (T = 7,8; C = 2,6), que se prepararon por mezcla de volúmenes iguales de las disoluciones que se describen a continuación:

- Disolución acuosa de poliacrilamida (T = 30,8, C = 2,6)
- Disolución de dimetilamino-propionitrilo al 1,6 % (p/v) en tampón tris-glicina 100 mM en tris y 770 mM en glicina, de pH 8,5.
- Disolución acuosa de ferricianuro potásico al 0,03 % (p/v)
- Disolución acuosa de persulfato amónico al 0,48 % (p/v)

Finalmente se adicionan unas gotas de agua con ayuda de una jeringa hipodérmica para conseguir una superficie libre plana.

El volumen de muestra aplicado varió entre 10 y 300 μ l según fue la concentración de la muestra enzimática. La adición de muestra se realizó junto con disolución de azul de bromofenol previamente densificada al 50% (v/v) con glicerina, para lograr una deposición adecuada del conjunto.

La electroforesis anódica se llevó a cabo a 4°C con una intensidad de corriente de 3 mA/gel a pH 8,5, correspondiente al de la disolución reguladora de tris (25 mM)-glicina (200 mM). La electroforesis transcurrió el tiempo necesario para que el indicador alcanzara la parte inferior del gel.

La electroforesis catódica se desarrolló con 3 o 4 mA/gel durante 1,5 o 3 h, en las mismas condiciones que la anódica, si bien sin el marcador, el azul de bromofenol, pero con el densificante, la glicerina.

4.10.2 ELECTROFORESIS DISCONTINUA

Se procedió según el método de Davis (1964) y Cooper (1977). Para la preparación del gel separador (T = 7,8; C = 2,6) se procedió introduciendo en tubos cilíndricos (5 mm de diámetro interno, 65 mm de longitud), 1,6 ml de una disolución que constó de:

- 0,38 volúmenes de disolución acuosa de acrilamida (T = 46, C = 2,6)
- 0,08 volúmenes de disolución de tampón tris (1,87 M)-HCl de pH 8,9
- 0,20 volúmenes de disolución de persulfato amónico al 0,175 % (p/v)
- 0,0032 volúmenes de disolución comercial de N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED)

- Agua bidestilada hasta completar un total de dos volúmenes.

Para lograr entre los dos geles una interfase perfectamente plana, se adicionó con una jeringa hipodérmica, un pequeño volumen de agua bidestilada después de los 1,6 ml de la disolución gelificante.

Una vez que hubo polimerizado el gel separador, se extrajo el agua con papel absorbente y se adicionaron 0,2 ml de disolución del gel concentrador ($T = 2,2$, $C = 0,2$) que contenía:

- Un volumen de disolución acuosa de acrilamida ($T = 15,6$, $C = 0,2$)
- Un volumen de disolución acuosa de riboflavina del 0,0025 % (p/v)
- Un volumen de disolución tampón tris(0,29 M)-fosfórico (0,16 M) de pH 6,3 - 6,5
- Cuatro volúmenes de agua bidestilada

Se repitió en este caso, la adición de agua para lograr una superficie libre plana y se dejó polimerizar con ayuda de radiación UV.

Posteriormente, se procedió a la adición de la muestra junto con el indicador (disolución acuosa de azul de bromofenol al 0,05% (p/v), densificada con glicerina) en proporción de 0,1 ml/ml de disolución de muestra. En el reservorio superior se dispuso de una disolución amortiguadora de tris (50mM)-glicina (38 mM) de pH 8,3. En el reservorio inferior, el tampón fue de tris (0,37 M)-HCl y del mismo pH.

La electroforesis transcurrió a un voltaje constante de 75 V hasta que el indicador alcanzó la parte inferior del gel.

4.11

ELECTROFORESIS EN TIRAS DE ACETATO DE CELULOSA

Las tiras de acetato de celulosa se sumergieron durante 15 min en el tampón de la electroforesis (tampón fosfato sódico 50 mM de pH 7,4), transcurridos los cuales se secaron superficialmente con papeles de filtro y se tendieron en el puente de la cámara electroforética ATOM AC/4 de forma que la superficie absorbente quede hacia arriba. Por medio de una micropipeta, se aplicaron 10 - 25 μ l de la muestra proteica a una distancia de 3 cm del cátodo. La electroforesis se prolongó durante 75 - 90 min a 4^o C con una tensión constante de 200 V.

Una vez finalizada la electroforesis se extrajeron las tiras de la cubeta y se sumergieron en el volumen necesario del correspondiente revelador específico. En algunos casos, cuando la movilidad de los distintos enzimas es muy similar, para obtener resultados comparables se cortaron las tiras longitudinalmente en dos partes, y cada una de ellas se sometió al correspondiente revelado. Ello ha ocurrido con las actividades LDH y MDH.

4.12

REVELADO ESPECIFICO DE LA LDH

El revelado LDH se efectuó con una disolución de 1 mg/ml de NAD, 0,5 mg/ml de NBT, 0,03 mg/ml de PMS y 3 % (v/v) de lactato en tampón tris (100 mM) - HCl de pH 8,5. Básicamente, es el método descrito por Thorne (1963).

4.13

REVELADO ESPECIFICO DE LA MDH

La MDH se ha revelado según el método de Tsou et al (1956), con una disolución de 1 mg/ml de NAD, 0,5 mg/ml de NBT y 5 % (v/v) de malato 0,12 M en tampón tris (100 mM) - HCl de pH 8,5.

4.14-

REVELADO ESPECIFICO DE LA ADA

La actividad ADA se puso de manifiesto en los geles de poliacrilamida, mediante el método de Spencer et al (1968). Se disolvieron 10 mg de adenosina y 0,2 g de agar en 15 ml de fosfato sódico 100 mM de pH 7,5 y la mezcla se calentó a 90°C. La disolución se enfrió a 45°C y se le añadieron 8 μ l de disolución de PNP comercial (1 mg/ml, A.E. 25 U/mg), 8 μ l de XO comercial (10 mg/ml, A.E. 0,4 U/mg), 2 mg de MTT y 2 mg de PMS disueltos en 5 ml de fosfato sódico 100 mM de pH 7,5. Los geles de poliacrilamida se colocaron en tubos que contenían la mezcla y se incubaron en la obscuridad a temperatura ambiente durante 20 min. La actividad enzimática se localizó en bandas de color azul que destacaban sobre fondo amarillo. El color azul no quedaba fijado sobre el gel de poliacrilamida sino que se difundía a través del gel de agar.

4.15

REVELADO ESPECIFICO DE LA GAH

El revelado específico de esta actividad se efectuó de acuerdo con el método propuesto por Martínez-Farnós et al (1978) con disolución de guanina 40 μ M y utilizando como aceptor electrónico de la xantina oxidasa comercial, el INT (1 mg/ml).

4.16

REVELADO ESPECIFICO DE LA PNP

El revelado de la PNP se efectuó con disolución de inosina 300 μ M, acoplado XO comercial (1% (v/v)) y con el INT como aceptor electrónico.

4.17

METODOS CROMATOGRAFICOS

4.17.1

FILTRACION EN GEL DE SEPHADEX G-25 Y G-50

La eliminación rápida de sales o de metabolitos endógenos y el cambio en el tipo de tampón en los preparados enzimáticos se llevó a cabo por filtración a través de columnas preempaquetadas de gel de Sephadex G - 25 y denominadas PD 10. La columna se equilibra pasando a su través 25 ml del tampón correspondiente; se aplican 2,5 ml de la muestra que se deja penetrar en la columna y se eluyen posteriormente con 3,5 ml del mismo tampón. La columna se lava con 25 ml de tampón antes de ser empleada de nuevo.

En el caso de eliminación de sales del extracto de hígado de pollo (véase 4.27), se utilizó una columna K26/25 (Pharmacia Fine Chemicals) empaquetada con gel de Sephadex G-50 (desgasificado), hasta una altura de 20 cm. Tras el equilibrado de la columna, la aplicación de la muestra, en un volumen siempre inferior al 30% del volumen de la resina, se llevó a cabo con ayuda de una bomba peristáltica LKB (2120 Varioperpex) conectada a la salida de la columna. La fracción exenta de sales se recogió desde el comienzo de salida de las proteínas, hasta unos ml antes del final de salida de la proteína. La cantidad de proteína fué registrada a 280 nm con ayuda de un espectrofotómetro de flujo continuo LKB (8300 Uvicord UV II) conectado a la salida de la columna, tras la bomba peristáltica.

4.17.2

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

El intercambiador fué el gel de DEAE - Sepharose CL 4B, que se lavó varias veces con agua y a continuación con el tampón correspondiente. Cuando el pH fué próximo al de la elución, se llenó la columna K16/40 (Pharmacia Fine Chemicals) hasta una altura de 26cm y en ella se completó el equilibrado. La operación se llevó a cabo empleando una velocidad de flujo ligeramente superior a la de elución, y se dió por finalizada cuando la con-

ductividad del tampón fué igual a la entrada y a la salida de la columna, lo que se comprobó por medida conductimétrica con un aparato Radiometer CDM 2e provisto de una célula de conductividad (Philips) de 1 cm.

A continuación se aplicó la muestra que contenía 300 mg de proteína de la fracción soluble (véase 4.1) y se realizó un lavado con el tampón de equilibrado hasta ausencia de proteína en los eluidos. La elución de los enzimas en estudio se llevó a cabo por aplicación de un gradiente de NaCl entre 0 y 0,3 M (700 ml totales) formado en un mezclador Pharmacia GM-1. A lo largo de todo el proceso, el flujo se mantuvo constante por medio de una bomba peristáltica LKB (varioperpex 2120) intercalada entre la salida de la columna y el espectrofotómetro LKB (8300 UV Uvicord II) acoplado al colector de fracciones Gilson (Escargot V F C). El flujo fué de 30 ml/h y se recogieron fracciones de 5,25 ml. El gradiente de cloruro sódico se determinó por medida de conductividad en un aparato Radiometer CDM 2e.

4.17.3

CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSE CL 4B

La determinación de la homogeneidad de la fracción microsomal en cuanto a tamaño de partícula, se llevó a cabo por filtración en gel de Sepharose CL 4B. Con el gel desgasificado y equilibrado con el tampón de elución, se llenó la columna K26/70 (Pharmacia Fine Chemicals) y se procedió como se ha descrito en el apartado anterior. La muestra, en este caso se compuso del residuo microsomal, tratado convenientemente y resuspendido en el tampón de equilibrado de la columna. El volumen de muestra no sobrepasó el 2% del contenido de la columna y se aplicó tras pasar por un filtro Millipore AP2501300 para eliminar los fragmentos de tamaño superior a 8 μm que no se habían disgregado convenientemente.

La elución se llevó a cabo con el tampón con el que se equilibró la columna; las fracciones se recogieron en un colector LKB (2112 Redirac) regulado para el volumen de 4,3 ml. A lo largo de todo el proceso, el flujo, de 18 ml/h, se mantuvo constante por medio de una bomba peristáltica LKB (2120 Varioperpex), intercalada entre la salida de la columna y el espectrofotómetro LKB (8300 UV Uvicord II) acoplado al colector de fracciones.

Antes de ser pasada una nueva muestra, se lavó la columna con dos volúmenes del tampón usado. Cuando se varió el tampón, se pasaron dos volúmenes de columna del nuevo tampón y se comprobó que la columna estuviese equilibrada por medida de la conductividad y como se ha descrito anteriormente (4.17.2)

4.18 ENFOQUE ISOELECTRICO

4.18.1 ENFOQUE ISOELECTRICO ANALITICO EN PLACAS DE AGAROSA

Se procedió en líneas generales siguiendo el método de Pharmacia Fine Chemicals (1980). Se utilizó una unidad electroforética FBE 3000 (Pharmacia Fine Chemicals).

Las placas de agarosa se prepararon por calentamiento de 0,3 g de agarosa "IEF" (Pharmacia Fine Chemicals) en una disolución de 3,6 g de sorbitol en 27 ml de H₂O. Tras la disolución de la agarosa, se añadieron 1,9 ml de anfolito (40%) del margen adecuado y se preparó la placa en una hoja de 114 x 225 mm de "Gelbond film" (Marine Colloids Division).

La aplicación de muestra se efectuó con ayuda del papel absorbente Scheleicher - Schüll (Blood Collection Paper) de 10 x 5 mm, que absorben 25 µl de la muestra. Los aplicadores se eliminaron transcurridos 45 min del comienzo del experimento.

La disolución catódica empleada fué de NaOH 1M y la anódica estaba compuesta de ácido sulfúrico 0,05M para anfolitos de margen 3-10, y de l-histidina 0,2M cuando se usaron anfolitos de margen 8 - 10,5.

Para el caso de anfolitos de margen 3 - 10, el enfoque isoelectrico se inició con un voltaje de 500 V y una potencia límite de 15 W la cual se mantuvo durante todo el experimento. El voltaje no sobrepasó en ningún momento los 1.500 V. El enfoque se desarrolló hasta transcurridos 15 min después de enfocada la hemoglobina que se usó como marcador (unos 75 min). Cuando se usaron anfolitos de margen 8 - 10,5 el electroenfoco se inició con una potencia límite de 5 W y se prolongó por espacio de 150 min sin que se sobrepasaran los 600 V.

El revelado LDH y MDH de las placas se efectuó de forma análoga a la desarrollada en geles de poliacrilamida. Tras su revelado, las placas se sumergieron en una disolución fijadora (ácido sulfosalicílico, ácido tricloroacético y agua en proporción 5::10::85) por espacio de 30 min. Después, las placas se lavaron en disolución de etanol, ácido acético y agua (en proporción 35::10::65), dos veces y por espacio de 15 min cada vez. Finalmente las placas se secaron según el método recomendado por Pharmacia Fine Chemicals (1980) y con papel absorbente Schleicher - Schüll (3354 Dassel).

4.18.2

ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO EN COLUMNA

Se procedió según el método de LKB (1976) basado en el propuesto por Vesterberg y Berggren (1966).

Se utilizó una columna 8100 - 1 (LKB) de 110 ml y una fuente de corriente continua ACPS 3000/150 (Pharmacia Fine Chemicals). La columna se mantuvo refrigerada a 10°C mediante una circulación continua de agua (5 - 10 l/min).

La disolución catódica fué de hidróxido sódico en disolución de sacarosa (6 ml de NaOH 1M, 15 g de sacarosa y 10 ml de H₂O), mientras que la disolución anódica fué de ácido fosfórico 0,15M (10 ml).

Para formar el gradiente de densidad, se utilizaron dos disoluciones (ligera y densa) de sacarosa :

- La disolución ligera contuvo los microsomas a enfocar y se preparó por homogeneización del residuo microsomal en 55 ml de sacarosa 0,28M. De esta suspensión se tomaron 52 ml a los que se añadieron 2 ml de anfolito (40%) de margen 3-10.

- La disolución densa se preparó al mezclar y disolver 2 ml de anfolito (40%) de margen 3-10, 27 g de sacarosa y 35 ml de H₂O, con un total de 54 ml, al igual que la disolución ligera.

El gradiente , a partir de estas dos disoluciones se formó a un flujo de 60 - 120 ml/h, con ayuda de un formador de gradientes (figura 6 a) para conseguir un gradiente lineal a partir de dos disoluciones de diferente densidad.

El proceso de electroenfoco se inició con un voltaje de 520 V, una potencia límite de 5 W y se concluyó a las 15 h, con un voltaje de 1500 V.

La elución de los microsomas se efectuó, como en el caso de existir un precipitado proteico, por la parte superior de la columna, y mediante la serie de operaciones que a continuación se indican :

(1) Tras desconectar la fuente de la red, se cerró la válvula 14 (figura 6 b).

(2) Con ayuda de una jeringa y un tubo capilar (1 mm de diámetro interno y 2 mm de diámetro externo) que se hizo reposar sobre la válvula 14, se extrajo la disolución de

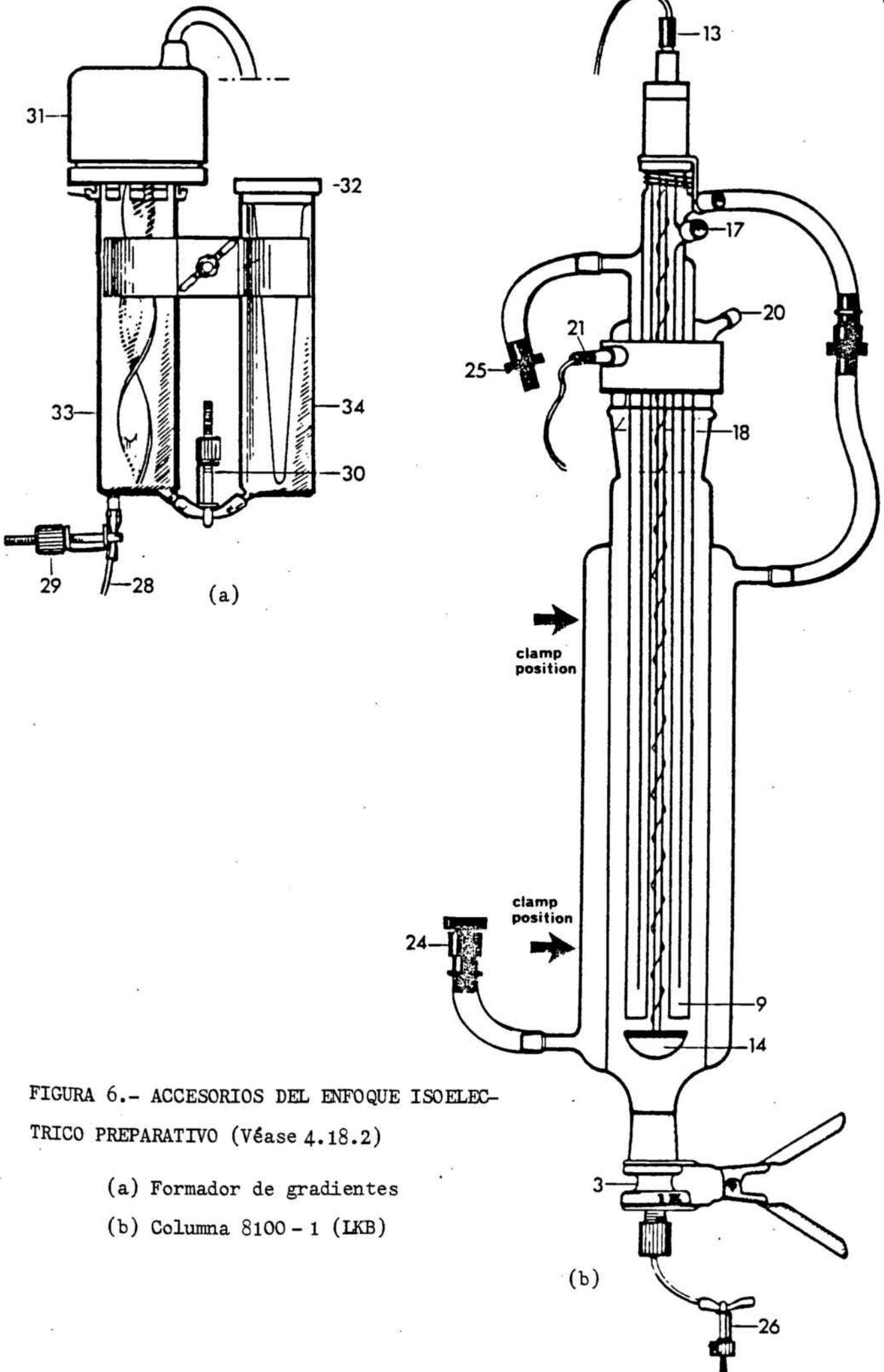


FIGURA 6.- ACCESORIOS DEL ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO (Véase 4.18.2)

(a) Formador de gradientes

(b) Columna 8100-1 (LKB)

electrodo densa

(3) Con una bomba peristáltica, a un flujo de 2 ml/min, se extrajo la disolución ligera hasta 10 mm por debajo del electrodo superior .

(4) Se preparó un tubo capilar con un terminal doblado en horquilla y en forma de embudo en sus 3 mm finales

(5) El tubo en horquilla se introdujo por la abertura 20 (figura 6 b) hasta unos 5 mm por debajo del nivel del líquido

(6) Se conectó una bomba peristáltica en el otro extremo del capilar y se extrajeron los 5 mm del líquido a un flujo de 2 ml/min

(7) El extremo en horquilla se bajó otros 5 mm por debajo del nuevo nivel del líquido

(8) Con ayuda de otro tubo capilar y otra bomba peristáltica, se introdujeron 5 ml de H_2O a un flujo de 2 ml/min. Por medio del tubo en horquilla se extrajeron los 5 mm de líquido y los 5 ml de agua a un flujo de 2 ml/min y en dos fracciones aproximadamente iguales

(9) Se bajó el tubo en horquilla 5 mm por debajo del nuevo nivel del líquido. Se añadieron 5 ml de agua y se extrajeron de nuevo ambas zonas en dos fracciones

(10) El procedimiento se repitió hasta que se recogió la zona correspondiente a la fracción microsomal enfocada.

Una modificación de este método permitió la extracción de los microsomas de la columna en un período de tiempo menor. Para ello, en el punto (5) se introdujo el tubo en horquilla hasta unos 2 mm por encima de la zona de microsomas enfocados. Ello permitió , en una sola etapa, la elución del líquido contenido por encima de los microsomas. El resto de la operación se realizó como ya se ha descrito y se obtuvieron, de forma rápida, los

microsomias en dos fracciones cuyo pH se determinó de forma inmediata.

El resto de la elución se efectuó por la parte inferior de la columna y a un flujo de 1,2 ml/min, en fracciones de 3 ml.

En todas las fracciones recogidas se determinó el pH de forma inmediata.

4.19

ULTRACENTRIFUGACION ISOPICNICA EN "PERCOLL"

Se procedió en líneas generales según el método de Pharmacia Fine Chemicals (1977).

Para conseguir los gradientes, se utilizaron los rotores 35 FA y 75 Ti de una ultracentrífuga Beckman L-5-75 H. Estos rotores son de ángulo fijo, el cual tiene un valor de 25° para el 35 FA y de 25,5° para el 75 Ti. El gradiente de "Percoll" (Pharmacia Fine Chemicals) se generó durante el proceso de ultracentrifugación.

La disolución sometida a ultracentrifugación se obtuvo por mezcla de la suspensión de microsomias con la cantidad adecuada de una disolución stock de Percoll considerada del 100%. La isoosmolaridad se consiguió con sacarosa cuya concentración en la mezcla final se calculó que fuese 0,25M.

El experimento transcurrió a 25.000 rpm (35 FA) durante 1 h y a 30.000 rpm (75 Ti) durante 30 min.

La elución se efectuó desde el fondo de los respectivos tubos de centrífuga con ayuda de una aguja de punta roma conectada a una bomba peristáltica, con un flujo de 0,5 ml/min, en el caso de los tubos del rotor 75 Ti; y de 1 ml/min en el caso de los tubos del rotor 35 FA.

La densidad de las fracciones se calculó a partir de los da-

tos de índice de refracción obtenidos con un refractrómetro Abbe (Zeiss Opton).

4.20

DETERMINACION DEL CONTENIDO EN PROTEINA

La determinación del contenido en proteína en las distintas muestras se efectuó por los métodos espectrofotométricos de Warburg y Christian (1941) por lectura a 260 y a 280 nm, y de Whitaker y Granum (1980) por lectura a 235 y a 280 nm.

Cuando el contenido proteico de las disoluciones fué poco significativo, se usó el método de Löwry et al (1951). Para ello se tomaron 0,1 ml de la disolución problema diluída convenientemente, y a continuación se añadió 1 ml de una disolución de carbonato sódico al 2% y sulfato de cobre pentahidratado al 0,5 % en tartrato de sodio y potasio al 1%; en la proporción 50::1. Transcurridos 10 min, se añadieron 0,1 ml de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu a temperatura ambiente y se mezcló rápidamente. Se dejó a temperatura ambiente por espacio de 30 min para que se desarrollase el color y seguidamente se leyó su absorbancia a 500 y a 750 nm frente a un blanco, en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 8-100. Los valores de absorbancia obtenidos, se transformaron en mg proteína/ml mediante una curva estándar que se confecciona paralelamente a cada ensayo, con albúmina bovina cristalizada a unas concentraciones entre 0,05 y 0,5 mg/ml.

El perfil de elución de proteínas durante los procesos cromatográficos, de enfoque isoeléctrico o de centrifugación isopícnica, se determinó por medio de un espectrofotómetro LKB, modelo 8300 Uvicord II, de flujo continuo, provisto de una cubeta de 0,1 ml y de 3 mm de paso de luz. El espectrofotómetro se intercaló entre la salida de la columna y el colector de fracciones. En los eluidos, propiamente dichos, el perfil de

proteína se determinó por medida de absorbancia a 230 o a 280 nm.

En las suspensiones de partículas, tanto en lavados como en eluidos, el contenido en proteína se estimó por medida de absorbancia a 260, a 280 y a 550 nm. En la región UV (260 y 280 nm), las suspensiones se diluyeron convenientemente para que las medidas estuviesen comprendidas entre 0 y 0,4 A. En este margen (y al menos hasta 0,5 A), las suspensiones cumplen la ley de Beer-Lambert.

4.21

DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

La determinación de las actividades enzimáticas de forma continua se llevó a cabo espectrofotométricamente por medida de los incrementos o decrementos de absorbancia provocados por la variación de concentración de los substratos y los productos. Todas las medidas se han efectuado en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 1700 termostatzado, provisto de un inscriptor AR 25 y en cubetas de 10 mm de paso de luz.

4.21.1

ENZIMAS DEL CATABOLISMO PURINICO

En los experimentos cinéticos, se ha trabajado a $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ y el tampón utilizado ha sido tris (34 mM)-HCl, pH 7,4 o tris (34 mM)-HCl - fosfato sódico (50mM), pH 7,4. Este último tampón se usó cuando el P_i fué el cofactor de la reacción (PNP). En el estudio de determinadas inhibiciones, fué preciso emplear cubetas de 2 mm de paso de luz debido a la elevada absorbancia de los reactivos empleados.

4.21.1.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ADA

La actividad de la adenosina desaminasa se determinó espectrofotométricamente, por medida de los descensos de absorbancia a 265 nm (Kalckar 1947 b) debidos a la desaparición de adenosina. A esta longitud de onda, corresponde la máxima diferencia de los valores de absortividad molar para adenosina e inosina (tabla VII).

En ciertos casos, ha sido preciso efectuar las determinaciones a 238 nm, en que tanto la adenosina como los posibles inhibidores de la ADA, tienen una menor absortividad molar y es posible trabajar a unas concentraciones más altas de los productos. A esta longitud de onda, la sensibilidad del método es menor que a 265 nm (tabla VII).

4.21.1.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GAH

La actividad de la guanina aminohidrolasa se determinó por medida de descensos de absorbancia a 248 nm (Kalckar 1947 a), longitud de onda a la cual existe la máxima diferencia de absorbancia entre la guanina y la xantina (tabla VII).

4.21.1.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD 5'N

4.21.1.3.1 Sistema AMP - 5'N - adenosina

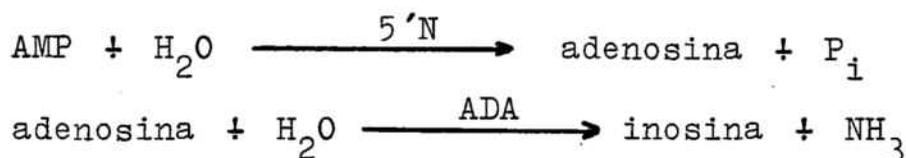
La actividad de este sistema se ha determinado por medida de los descensos de absorbancia a 265 nm a causa de la disminución en la concentración de adenosina. Este método es acoplado y está basado en la adición a la cubeta de reacción, de ADA comercial en suficiente cantidad (3,4 U/ml) para que transforme rápidamente la adenosina que se va formando, en inosina (Kalckar 1947 c) (tabla VII).

T A B L A V I I

INCREMENTOS DE ABSORTIVIDAD MOLAR A LAS LONGITUDES
DE ONDA A LAS QUE SE DETERMINO LA ACTIVIDAD

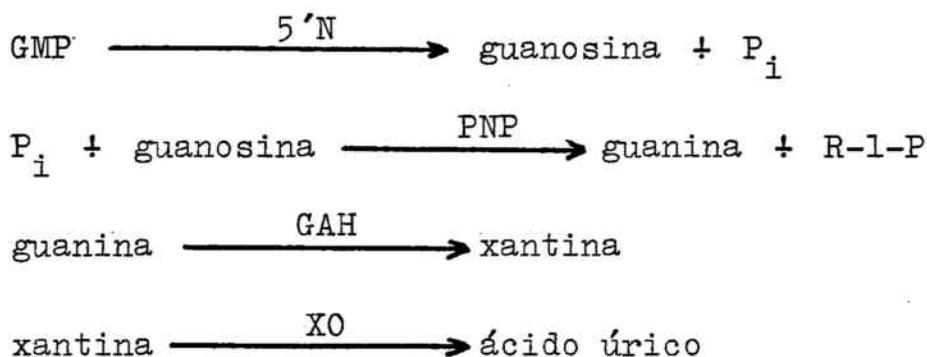
ENZIMA	SISTEMA	λ (nm)	ϵ (A/M cm)
ADA	adenosina - inosina	265	7.800
ADA	adenosina inosina	238	3.000
GAH	guanina - xantina	248	4.700
5'N	AMP - inosina	265	8.400
5'N	GMP - ácido úrico	293	10.300
5'N	IMP - ácido úrico	293	11.900
5'N	XMP - ácido úrico	293	9.800
PNP	inosina - hipoxantina	280	1.000
PNP	inosina - ácido úrico	293	11.900
PNP	guanosina - guanina	260	5.100
PNP	xantosina - ácido úrico	293	8.700

El esquema de hidrólisis del AMP según este método, es el siguiente :



4.21.1.3.2 Sistema GMP - 5'N - guanosina

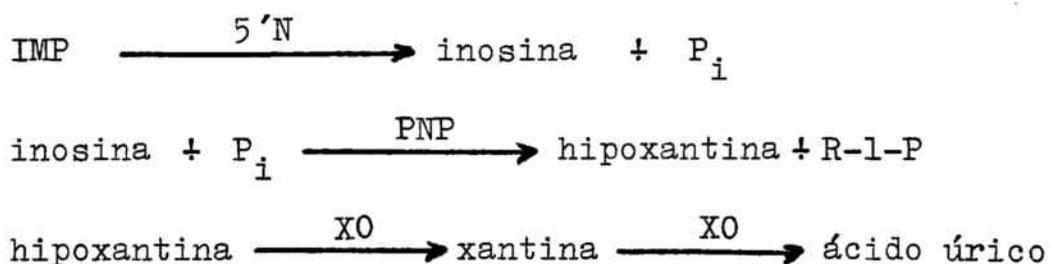
Este sistema fué estudiado a 293 nm mediante el método acoplado en que intervino la GAH (0,04 U/ml), la PNP (0,075 U/ml) y la XO (0,03 U/ml) comerciales, mediante el esquema siguiente:



Los valores de absortividad molar para el GMP y el ácido úrico se resumen en la tabla VII.

4.21.1.3.3 Sistema IMP - 5'N - inosina

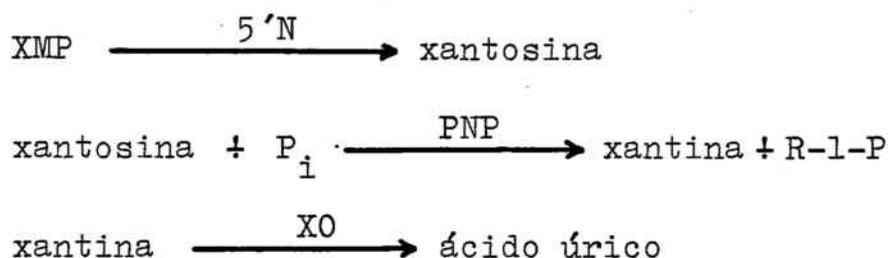
En este sistema, las determinaciones se han efectuado por medida de los incrementos de absorbancia a 293 nm, debidos a la aparición de ácido úrico provocada por la adición de PNP (0,05 U/ml) y XO (0,013 U/ml) comerciales a la cubeta de reacción, y según el esquema siguiente :



Los valores de absorptividad molar para IMP y para el ácido úrico a 293 nm, se resumen en la tabla VII.

4.21.1.3.4 Sistema XMP - 5'N - xantósina

Análogamente a los casos anteriores, las determinaciones se efectuaron a 293 nm. En este método, es necesario acoplar PNP (0,2 U/ml), activa con la xantósina, y XO (0,027 U/ml) comerciales, mediante el esquema de actuación siguiente:



Los valores de absorptividad molar para XMP y para el ácido úrico a 293 nm, se resumen en la tabla VII.

En todos los casos se ha aprovechado la alta sensibilidad del método que ha hecho posible el estudio cinético en estos sistemas, cuyas velocidades no son elevadas.

4.21.1.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PNP

4.21.1.4.1 Sistema inosina - PNP - hipoxantina

Las determinaciones se realizaron por medida de los descensos de absorbança a 280 nm, debido a la desaparición de inosina. Este método es menos sensible que el descrito acoplando XO, pero es el único hábil para poder estudiar posibles inhibiciones tanto por hipoxantina como por xantina.

Sin embargo, en determinadas condiciones, para las comparaciones de actividades, se utilizó el sistema acoplado para el

cual se incluyeron 0,013 U/ml de XO comercial y se midieron las apariciones de ácido úrico a 293 nm (tabla VII).

4.21.1.4.2 Sistema guanosina - PNP - guanina

La actividad en este sistema, se ha determinado a 260 nm, punto isosbético de la guanina y la xantina, por medida de los descensos de absorbancia debidos a la desaparición de la guanosina. A pesar de la poca sensibilidad del sistema, se ha trabajado a esta longitud de onda dado que, en los preparados enzimáticos, acompañando a la PNP, se halla la GAH la cual transforma a la guanina en xantina e interferiría en las determinaciones (tabla VII).

4.21.1.4.3 Sistema xantosina - PNP - xantina

La actividad en este sistema se ha ensayado a 293 nm por medida de los incrementos de absorbancia debidos al ácido úrico, por el método acoplado en que intervino la XO (0,012 U/ml) comercial (tabla VII).

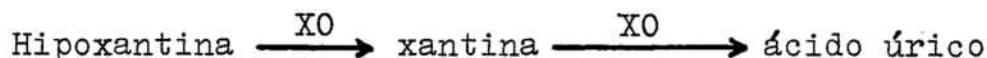
4.21.1.4.4 Sistema adenosina - PNP - adenina

La posible actividad de la PNP con adenosina, se ha ensayado a 255 nm, longitud de onda a la cual existe la máxima diferencia de absorptividad molar entre la adenosina y la adenina, si bien, el método es de muy escasa sensibilidad (tabla VII).

4.21.1.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD XO

La posible actividad xantin oxidásica se estudió, en primer lugar a 293 nm, donde existe el máximo de absorción del ácido úrico, mientras que la xantina absorbe poco (tabla VII).

El enzima cataliza las reacciones siguientes :



y se ha estudiado la posible actividad para la segunda de las reacciones reseñadas.

Alternativamente, se trabajó a 340 nm y con una concentración de NAD, en cubeta, de 500 μM para estudiar la posible necesidad del cofactor para la actividad enzimática.

4.21.2 ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS DEL CATABOLISMO PURINICO EN LOS EXPERIMENTOS DE LAVADO DE LAS FRACCIONES PARTICULADAS

Los substratos utilizados han sido, la adenosina para la ADA, la guanina para la GAH, la guanosina para la PNP y el AMP para la 5'N.

Con objeto de evitar la elevada absorbancia de la mezcla de reacción en la región UV, la concentración de los substratos ha sido, en todos los casos, de 50 μM en cubeta. La temperatura de los ensayos fué de $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Los métodos de determinación de actividad fueron idénticos a los comentados en el capítulo anterior. Las reacciones se llevaron a cabo en un medio tamponado de pH 7,4 compuesto de sacarosa 0,28 M, tris (25mM)-HCl, EDTA 1 mM; y además de fosfato sódico 50 mM en el caso de la determinación de actividad PNP. Cuando se determinó la actividad 5'N, se eliminó el EDTA.

4.21.3 ENZIMAS MARCADORES DE ORGANULOS SUBCELULARES

4.21.3.1 METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS CONTINUOS

La temperatura de los ensayos fué de $30 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

4.21.3.1.1 Determinación de la actividad LDH

La actividad de la lactato deshidrogenasa se determinó por medida del decremento de absorbancia a 340 nm, debido al NADH, en un medio tamponado de sacarosa 0,28 M, tris (34 mM)-HCl y EDTA 1 mM de pH 7,4.

La concentración de piruvato y NADH en cubeta fué de 800 μM y 85 μM respectivamente. El incremento de la absortividad molar para esta reacción es a 340 nm de 6.200 A/M cm.

4.21.3.1.2 Determinación de la actividad MDH

La actividad de la malato deshidrogenasa se determinó por medida del descenso de absorbancia a 340 nm debido al consumo de NADH y en un medio tamponado idéntico al caso de la LDH.

La concentración de oxalacetato y de NADH en cubeta fué de 350 μM y 100 μM respectivamente. El incremento de la absortividad molar para esta reacción es a 340 nm de 6.200 A/M cm.

4.21.3.1.3 Determinación de la actividad GDH

La determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa se llevó a cabo por medida del descenso de absorbancia a 340 nm, debido al NADH (Schmidt 1974). Las concentraciones en la mezcla de reacción fueron 0,2 mM en NADH, 1 mM en ADP, 2,5 mM en EDTA, 100 mM en acetato amónico y 7 mM en α -cetoglutarato preparados en un medio tamponado de trietanolamina 50 mM de pH 8. El incremento de la absortividad molar es a 340 nm de 6.200

A/M cm.

4.21.3.1.4 Determinación de la actividad de la catalasa

La determinación de la actividad catalásica se llevó a cabo por lectura de descensos de absorbancia a 240 nm, debidos al H_2O_2 , en un medio tamponado de fosfato sódico 50 mM de pH 6,8, a $30 \pm 0,1$ °C. La concentración de H_2O_2 en la cubeta del espectrofotómetro fué 10,2 mM y su absortividad molar es 40 A/M cm (Aebi 1974).

4.21.3.1.5 Determinación de la actividad de la NADPH-citocromo c reductasa

Esta actividad se determinó según una modificación de los métodos de Mackler (1957) y de B.S.S. Masters et al (1957) por medida de los descensos de absorbancia a 550 nm debidos a la reducción del ferricitocromo c. Las cubetas usadas fueron de 10 mm de paso de luz y de 0,5 ml totales. En la mezcla de reacción se añadieron los siguientes reactivos preparados en tampón fosfato potásico 0,2 M y EDTA 0,1 mM de pH 7,5 :

- 0,1 ml de ferricitocromo c al 1 % (p/v)
- 0,1 ml de NADPH al 0,1 % (p/v)
- 0,2 ml de tampón - EDTA

La reacción se inició por adición de 0,1 ml de la disolución enzimática.

El incremento de absortividad molar para esta reacción es a 550 nm de 18.500 A/M cm (Hodges y Leonard 1974).

4.21.3.2

METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS DISCONTINUOS

Para la determinación de diversas actividades enzimáticas para las que no fueron adecuados los métodos espectrofotométricos continuos, se han empleado métodos discontinuos consistentes en incubaciones de los enzimas con sus substratos durante intervalos de tiempo fijos, seguidos de lectura de la absorbancia.

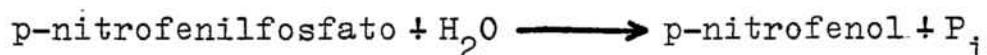
Las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 8-100 termostatzado, en cubetas de vidrio de 3 ml de capacidad y 10 mm de paso de luz, y a $30 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

En todos los casos se ha comprobado la relación lineal existente entre la concentración del producto formado y el intervalo de incubación, así como la concentración enzimática. Asimismo, en todos los casos, se confeccionaron los correspondientes blancos a tiempo cero, en los que el agente desnaturante se añadió a la mezcla de substratos previamente a la adición de la disolución enzimática.

4.21.3.2.1

Determinación de la actividad de la
fosfatasa ácida FA

El ensayo de la actividad de la fosfatasa ácida, se basó en la actividad hidrolítica del enzima sobre el p-nitrofenilfosfato, según la reacción:



El p-nitrofenol, en medio básico, presenta una coloración amarilla que puede determinarse por lectura a 405 nm (absorividad molar en las condiciones del ensayo: 18.500 A/M cm) (Bergmeyer 1974).

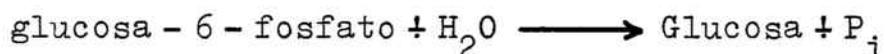
La velocidad de reacción no se puede determinar espectrofo-

tométricamente ya que el color solo se desarrolla en medio básico, mientras que la reacción se desarrolla a pH ácido.

La incubación se llevó a cabo a $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y la reacción se inició por adición de 0,2 ml de disolución enzimática, diluída adecuadamente, a 0,8 ml de una disolución de p-nitrofenilfosfato (18 mM) preparada en tampón citrato 0,1 M de pH 5,6. Transcurridos 5 min se detuvo la reacción por adición de 2 ml de disolución 0,5 M de NaOH y se determinó la absorbancia a 405 nm.

4.21.3.2.2 Determinación de la actividad de la glucosa - 6 - fosfatasa

La medida de la actividad de la glucosa - 6 - fosfatasa estuvo basada en la determinación colorimétrica del fosfato inorgánico liberado en la reacción:



El fosfato liberado se hace reaccionar con molibdato amónico en presencia de ácido ascórbico (reductor); la disolución se estabiliza por adición posterior de arsenito y citrato que complejan el exceso de molibdato y evitan su ulterior reacción con otros ésteres de fosfato o con el fosfato liberado por hidrólisis ácida del sustrato (Baginski et al 1974).

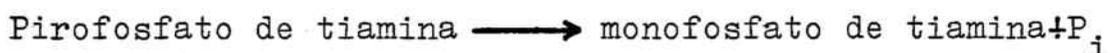
La incubación se realizó a $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y la reacción se inició por la adición de 0,1 ml de disolución enzimática, diluída convenientemente, a la mezcla de sustratos (0,4 ml): 20 mM en glucosa - 6 - fosfato, 0,2 mM en EDTA, 50 mM en sacarosa y 60 mM en tampón tris-maleato-NaOH de pH 6,5. Transcurridos 10 min, la reacción se detuvo por adición de 2 ml de una disolución al 2% (p/v) de ácido ascórbico en ácido tricloroacético al 10% (p/v). La proteína desnaturalizada se separó por centrifugación

a 4.000 x g, 10 min. La determinación del fosfato liberado se llevó a cabo por adición de 0,05 ml de molibdato amónico al 1% (p/v) a 1 ml del sobrenadante y, posteriormente de 1 ml de disolución de citrato sódico al 2% (p/v) y arsenito sódico al 2% (p/v) en ácido acético al 2% (p/v). Transcurridos 15 min se determinó la absorbancia a 700 nm.

Paralelamente se determinó la absorbancia de un blanco que en lugar de 0,1 ml de disolución enzimática, contenía 0,1 ml de tampón, y de un patrón que en lugar de dicha disolución enzimática, contenía 0,1 ml de disolución 1,5 mM de fosfato monopotásico en sacarosa 0,25 M.

4.21.3.2.3 Determinación de la actividad de la tiamín - pirofosfatasa

La determinación de la actividad de la tiamín - pirofosfatasa (Morre 1971) se realizó por medida colorimétrica de la concentración del fosfato inorgánico liberado en la reacción:



según el método de Fiske y Subbarow (1925) (véase 4.21.3.2.3.1).

La incubación se llevó a cabo a $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y la reacción se inició por adición de 0,3 ml de la disolución enzimática, diluída adecuadamente, a 8,7 ml de disolución de substrato que contuvo pirofosfato de tiamina 3,3 mM y CaCl_2 15 mM, en tampón veronal sódico 33 mM de pH 8,0. Tras 10 min de incubación, la reacción se detuvo por adición de 3 ml de disolución al 10% (p/v) de ácido tricloroacético. La proteína desnaturalizada se separó por centrifugación a 4.000 x g, 10 min y 1 ml del sobrenadante se utilizó para la determinación colorimétrica del P_i (véase 4.21.3.2.3.1).

4.21.3.2.3.1 Determinación del P_i por el método de Fiske y Subbarow

El método propuesto por Fiske y Subbarow (1925) para la determinación de fosfato, está basado en la reacción de éste con el molibdato amónico, en medio ácido, con formación de ácido fosfomolíbdico que una vez reducido por el reactivo de King, produce la aparición de un color azulado que puede determinarse a 660 nm.

El reactivo de King se preparó por disolución de 0,5 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico en 195 ml de disolución al 15% (p/v) de NaHSO_3 . Una vez conseguida la disolución, se adicionó a la misma 5 ml de sulfito sódico heptahidratado (10 g en 19 ml de H_2O). El reactivo es necesario que se prepare cada dos semanas y se conserva en atmósfera de nitrógeno y en frasco de color topacio.

Se ha determinado la curva patrón para cada preparación nueva del reactivo. El coeficiente de extinción molar fué 4.000 A/M cm con disoluciones de fosfato de potasio como patrones.

El desarrollo del color, previo a su determinación, se llevó a cabo por mezcla en el orden indicado, de los siguientes reactivos:

- (1) De 1 a 8 ml del sobrenadante claro, según la cantidad de fosfato presente en el mismo
- (2) Un volumen de agua tal que sumado al anterior, de un total de 8 ml:
- (3) 0,5 ml de H_2SO_4 5N
- (4) 1 ml de disolución de molibdato amónico al 2,5% (p/v)
- (5) 0,5 ml de reactivo de King.

Tras un intervalo de tiempo de 10 min, a partir de la adición

del último reactivo, el color se desarrolló totalmente y se pudo proceder a la lectura de la absorbancia a 660 nm, tal como se ha indicado anteriormente.

4.22

DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS

Los distintos parámetros cinéticos (constante de Michaelis K_m , velocidad máxima V y constantes de inhibición K_i), se han determinado estadísticamente, mediante un ordenador Tektronix 4051, por regresión lineal ponderada (método de mínimos cuadrados) de la ecuación de Michaelis - Menten (1913) simple o extendida al caso de inhibición (Cleland 1963); se supusieron errores simples en la velocidad inicial (v), o sea, el mismo error estándar para cada v (Cornish - Bowden 1976). Dado que el error se supone normal para v real y no para la v experimental, se efectuaron cinco iteraciones.

4.23

TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Suspensiones de microsomas tratados con distintos medios, y de vesículas sinápticas constituyeron las muestras con las que se efectuó el proceso preparativo previo a la obtención de las micrografías electrónicas.

4.23.1

PROCESO DE FIJACION

La fijación se ~~ha~~ realizado a 4 °C por mezcla de cantidades iguales de la suspensión de partículas en el medio A (sacrosa 0,28 M, tris 34 mM, EDTA 1 mM y HCl de pH 7,4) y de glutaraldehído al 5% (v/v) disuelto en el medio A. La mezcla tras 1,5 h de contacto, se centrifugó (18.000 x g, 30 min). El residuo cuyo espesor no superó los 0,5 mm, se lavó toda la noche en contacto con el medio A y posteriormente, con el tampón So-

rensen (66 mM de pH 7,4) durante 1 h. El residuo lavado se ha post-fijado con OsO_4 al 2% (p/v) en el tampón Sorensen. Con el osmio el contacto se mantuvo entre 15 y 30 min. Tras eliminar el OsO_4 el residuo se lavó tres veces con agua y por espacio de 1 h cada vez. Finalmente se añadió etanol al 70% para proceder a la deshidratación. El residuo se recuperó con ayuda de una espátula y la deshidratación se llevó a cabo por inmersión en series sucesivas de etanol: 70°, 80°, 90°, 95° y etanol absoluto.

4.23.2

PROCESO DE INCLUSION

Las muestras deshidratadas se han tratado con el disolvente del monómero, que no es soluble en agua, en el orden que se describe a continuación:

- Dos partes de etanol absoluto y una parte de óxido de propileno
- Una parte y una parte
- Una parte y tres partes
- Oxido de propileno absoluto.

El tiempo empleado en estas operaciones fué de 15 min, repitiéndose cada proceso tres veces. Las muestras así tratadas ya se pudieron introducir en el monómero y comenzar su polimerización en la forma habitual con "Araldite Durcupan ACM".

4.23.3

PROCESO DE ULTRAMICROTOMIA

Se trabajó con un ultramicrotomo Reichert OmU-2 con cuchillas de cuarzo o diamante y se tomaron muestras a distintos niveles del residuo, para que las observaciones fueran más representativas.

4.23.4

PROCESO DE TINCIÓN

La tinción se ha llevado a cabo con acetato de uranilo al 2% (p/v) según el método de Watson (1958), y citrato de plomo según la técnica de Reynolds (1963).

4.23.5

PROCESO DE OBSERVACION

La observación de las muestras se realizó en un microscopio electrónico EM 200 y EM 301, a 60 kV de aceleración y en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

PARTE EXPERIMENTAL

5.1

CATABOLISMO PURINICO EN LA FRACCION SOLUBLE
DE CEREBRO DE RATA

El recambio de los ácidos nucleicos (Imondi et al 1970) y de los nucleótidos (Henderson y Paterson 1973, Herscho et al 1967) en la célula, pone de manifiesto la importancia de los enzimas de la síntesis "de novo" de las purinas, de la vía de recuperación y la del catabolismo purínico. En el tejido cerebral, la síntesis "de novo" es mucho menor que en el tejido hepático (Howard et al 1970, Wong y Henderson 1972) y los niveles celulares de las distintas purinas se mantienen por el equilibrio dinámico entre las rutas catabólicas y las de recuperación y, eventualmente, por el aporte purínico por medio de la sangre, tal como se ha demostrado que ocurre en la médula ósea de conejo (Yamada 1961).

Algunos de los enzimas del catabolismo purínico son inhibidos por sus propios productos de reacción, por análogos estructurales de éstos y por los nucleótidos. Así, la xantina, la hipoxantina y la guanina inhiben a la purinnucleósido fosforilasa (PNP) de eritrocitos humanos (Krenitsky et al 1968); la adenosina, la inosina, la citidina y el fosfato inorgánico (P_i) a la 5'Nucleotidasa (5'N) de hígado de rata (Fox y Marchant 1974, Nakamura 1976) y la inosina a la adenosina desaminasa de duodeno de pollo y de hígado de buey (Hoagland y Fischer 1967, Fonoll et al 1982). La xantina inhibe a la guanina aminohidrolasa (GAH) de cerebro de cobaya (Martínez-Farnós et al 1978) y de hígado de buey (Galilea et al 1981), pero no afecta a la de músculo de bacalao (Roy 1967).

El AMP, el ADP, el ATP y el 3'5'AMP-c inhiben a la adenosina desaminasa (ADA) de eritrocitos humanos (Siegenbeek van Heukelom 1976); el ADP, el ATP, el GDP y el IDP inhiben a la 5'N de músculo liso de intestino delgado de cerdo (Burger y Lowenstein 1975), mientras que los 2'y 3'-nucleótidos inhiben al en-

zima de glándula pituitaria bovina (Lisowski 1966). La PNP de Bacillus cereus es inhibida por XMP, GTP y GMP, y también por AMP y ATP de forma cooperativa (Serra et al 1971). La alantoína y el GTP son efectores de la forma alostérica de GAH de hígado de rata (Josán y Krishnan 1968, Kumar y Krishnan 1970) y el ATP lo es de la 5'N de hígado de pollo y de rata (Itoh et al 1978, Van der Berghe et al 1977) y de cerebro de buey (Malloy y Bozal 1982).

La íntima relación existente entre las diversas reacciones que catalizan los enzimas comentados sugiere que sus actividades puedan condicionarse mutuamente a través de los intermediarios metabólicos comunes. En el presente capítulo se comparan los parámetros cinéticos de la adenosina desaminasa (ADA), guanina aminohidrolasa (GAH), 5'Nucleotidasa (5'N) y purinnucleósido fosforilasa (PNP) de tejido cerebral de rata, respecto de sus substratos, y se establece el efecto inhibitorio de los intermediarios metabólicos. Los resultados que se exponen pueden contribuir a la formación de hipótesis sobre la acción conjunta de los mencionados enzimas en el tejido cerebral de rata.

5.1.1 SISTEMA ADENOSINA - ADA - INOSINA

En la ADA de cerebro de rata se ha obtenido :

$$K_m = 54 \pm 1 \mu M$$

determinada con adenosina 25 - 150 μM y de 0,036 U/ml (de la fracción soluble. Véase 4.1). El valor concuerda con el del enzima de corteza cerebral de rata ($K_m = 54 - 57 \mu M$) (Pull y McIlwain 1974), pero difiere del enzima de cerebro de mono ($K_m = 32 \mu M$) (Tritsch et al 1976) y es superior también al encontrado para el enzima cerebral de otros orígenes (Arch y Newsholme 1978).

La ADA es inhibida competitivamente por la inosina (0,16 - 0,48 mM, 0,017 U/ml de ADA del purificado parcial - véase 4.2-):

$$K_i(\text{inosina}) = 570 \pm 20 \mu\text{M} ,$$

por la guanosina (0,083 - 0,25 mM, 0,017 U/ml de ADA del purificado parcial - véase 4.2-):

$$K_i(\text{guanosina}) = 300 \pm 40 \mu\text{M}$$

y por la adenina (0,39 - 0,79 mM, 0,017 U/ml de ADA del purificado parcial - véase 4.2-):

$$K_i(\text{adenina}) = 1,09 \pm 0,08 \text{ mM} .$$

Los resultados concuerdan con lo descrito para el enzima de duodeno de pollo (Hoagland y Fischer 1967). El AMP, la guanina y GMP, la hipoxantina e IMP, la xantina y XMP, o el ácido úrico, todos hasta 250 μM , no parecen afectar a la actividad del enzima.

5.1.2 SISTEMA GUANINA - GAH - XANTINA

En la GAH de cerebro de rata se ha obtenido:

$$K_m = 6,40 \pm 0,07 \mu\text{M}$$

determinada con guanina 10 - 60 μM y 0,010 U/ml de GAH. El valor es análogo al de la forma michaeliana del enzima de cerebro de ratón ($K_m = 6 \mu\text{M}$) y al valor de $s_{0,5}$ de la forma alostérica A de hígado de rata (5,3 μM) pero difiere del correspondiente a la forma B michaeliana del mismo tejido ($K_m = 20 \mu\text{M}$) (Kumar et al 1972). En otros casos, los valores que se indican varían en un margen amplio: 10,5 μM para hígado de conejo (Currie y Bray 1967), 11 μM para cerebro de cerdo (Rossi et al 1978), 80,6 μM para riñón de rata (Sanger y Sudhir 1970), 5 μM para suero humano (Carraway 1966) y 33 μM para músculo de bacalao (Roy 1966).

La xantina (0,01 - 0,05 mM, 0,01 U/ml de GAH) es inhibidor competitivo de la GAH :

$$K_i(\text{xantina}) = 119 \pm 5 \mu\text{M} .$$

La adenina, la adenosina y AMP, la guanosina y GMP, la inosina e IMP y el ácido úrico, la xantosina y XMP (hasta 100 μM) no parecen afectar a la actividad del enzima. Por su parte, el enzima de hígado de bacalao no es inhibido por la hipoxantina ni por la xantina (Roy y Roy 1967) y el de cerebro de cobaya es inhibido competitivamente por ambas purinas y por al ácido úrico, pero la adenina no afecta a su actividad (Martinez - Farnós et al 1978).

5.1.3

SISTEMA DE LA 5'NUCLEOTIDASA

La actividad 5'N de cerebro de rata no depende del ión Mg (II) para su actividad, en lo que concuerda con el enzima de cerebro de oveja (Ipata 1968), mientras que la actividad del enzima de hígado de pollo depende, de modo absoluto, de los iones divalentes (Itoh et al 1978).

La determinación de las velocidades iniciales con los diversos 5' monofosfato de purinnucleósidos conducen a los valores de la tabla VIII. Los valores de K_m del enzima de diferentes procedencias muestran una gran variabilidad (Lisowski 1966, Song y Bodansky 1966, Ipata 1967, Bossman y Pike 1971, Tanaka et al 1973, Malloí 1980).

Se pone de manifiesto que el orden relativo de velocidades máximas es inverso al de las constantes de Michaelis de los distintos substratos. Así, el substrato más afín es el AMP, cuya velocidad máxima es la mayor, seguido del IMP y del GMP, cuyas afinidades son comparables; el XMP es el peor substrato. En cerebelo de rata, el substrato más afín es el AMP (Bossman

TABLA VIII

ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATO DE LA 5'NUCLEOTIDASA

Substrato	Margen de concen- traciones (μM)	U/ml (a)	K_m (μM)	$V(b)$ $(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min mg protefina}})$	V relativa (b)	Coefficiente de efi- cacia (c)
AMP	5 - 190	0,005	24 ± 1	$0,095 \pm 0,002$	100	1
IMP	37 - 560	0,005	110 ± 4	$0,0583 \pm 0,0006$	62	0,13
GMP	100 - 500	0,005	220 ± 20	$0,043 \pm 0,002$	45	0,05
XMP	93 - 460	0,014	1400 ± 14	$0,017 \pm 0,003$	18	0,003

(a) Unidades de 5'N utilizadas en el ensayo, determinadas con respecto a su substrato AMP (véase 4.2)

(b) Los valores comparativos de V se han obtenido con el enzima del purificado parcial

(c) EL coeficiente de eficacia fue definido por Sols y Crane (1954)

y Pike 1971), mientras que en hígado de pollo lo es el IMP, seguido del GMP, el AMP y del XMP, cuya velocidad relativa es del 31 % respecto a la del IMP (Itoh et al 1978).

La adenosina (167 μM) inhibe a la 5'N el 98 % frente a IMP, el 92 % frente a GMP y el 70 % con XMP. Con AMP (75 μM), la inosina, la guanosina y la xantosina (333 μM) o la adenina, la guanina, la hipoxantina y el ácido úrico (250 μM) no afectan a la actividad de la 5'N. Sin embargo, se ha descrito la influencia de los nucleótidos purínicos sobre la actividad del enzima (Ipata 1967, 1968; Murray y Friedrichs 1969; Fox y Marchant 1974). Estas inhibiciones no se han considerado en el presente trabajo, ya que los nucleósidos di y trifosfato no se pueden considerar intermediarios del metabolismo (fig 4).

5.1.4

SISTEMA DE LA PURINNUCLEOSIDO FOSFORILASA

La determinación de las velocidades iniciales con los diversos nucleósidos purínicos, ha permitido obtener los valores que aparecen en la tabla IX.

El orden relativo de las velocidades máximas, indica que el enzima actúa preferentemente sobre la inosina o la guanosina, dependiendo de la concentración de nucleósido, ya que la velocidad máxima (V) es superior con inosina y la constante de Michaelis (K_m) es menor con guanosina. En cuanto a la xantosina, la afinidad del enzima por este substrato es alta, superior incluso a la de la inosina, aunque la velocidad máxima es muy pequeña. Por otra parte, la adenosina no es substrato del enzima.

Los resultados comentados son similares a lo descrito para

TABLA IX

ESPECIFICIDAD DE SUBSTRATO DE LA PURINNUCLEOSIDO FOSFORILASA

Substrato	Margen de concen- traciones (μM)	U/ml (a)	K_m (μM)	$V(b)$ $\left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min mg protefina}}\right)$	V relativa (b)	Coefficiente de efi- cacia (c)
INOSINA	28 - 307	0,004	97 ± 4	$0,59 \pm 0,02$	100	1
GUANOSINA	11 - 125	0,009	32 ± 2	$0,31 \pm 0,02$	52	1,6
XANTOSINA	33 - 167	0,096	34 ± 3	$0,0152 \pm 0,0004$	2,4	0,07
ADE NOSINA	hasta 200	0,096	-	-	< 0,5	-

(a) Unidades de PNP utilizadas en el ensayo, determinadas con respecto a su substrato inosina (véase 4.2)

(b) Los valores comparativos de V se han obtenido con el enzima del purificado parcial

(c) El coeficiente de eficacia fue definido por Sols y Crane (1954)

el enzima de Bacillus cereus (Gardner y Kornberg 1967), para el que la inosina es el substrato más afín seguido de la guanosina, mientras que las velocidades con xantosina y adenosina son muy reducidas. Por el contrario, frente al enzima parcialmente purificado de médula ósea de conejo, la inosina o la xantosina no son substratos o inhibidores (Yamada 1961). Asimismo, los valores de constantes de Michaelis asignados al enzima de diversas procedencias son muy variables (Friedkin y Kalckar 1950, Gardner y Kornberg 1967, Kim et al 1968 b, Sheen et al 1968, Agarwal y Parks 1969, Gilpin y Sadoff 1971, Serra et al 1971, Lewis y Glantz 1976).

La hipoxantina (10 - 120 μM , 0,005 U/ml de PNP de la fracción soluble -véase 4.1-) y la guanina (17 - 120 μM , 0,012 U/ml de PNP del purificado parcial exento de GAH -véase 4.2-) son inhibidores competitivos de la PNP. Con guanosina como substrato :

$$K_i(\text{guanina}) = 16 \pm 2 \mu\text{M} \text{ y } K_i(\text{hipoxantina}) = 22 \pm 2 \mu\text{M} .$$

Con inosina como substrato :

$$K_i(\text{hipoxantina}) = 39 \pm 3 \mu\text{M} \text{ y } K_i(\text{guanina}) = 23 \pm 3 \mu\text{M} .$$

Los valores de las constantes de Michaelis para inosina y guanosina y los de las constantes de inhibición para hipoxantina y guanina, concuerdan con el carácter reversible de la reacción catalizada por la PNP (Krenitsky et al 1968 a y b).

5.1.5

SISTEMA DE LA XANTINA OXIDASA

Se investigó la posible actividad xantina oxidasa en el tejido cerebral de rata con distintas concentraciones de xantina (hasta 100 μM), en ausencia o en presencia de NAD (hasta 500 μM), con la máxima concentración de proteína que no inter-

fiere en las determinaciones (0,05 mg/ml de la fracción soluble -véase 4.1- en la mezcla de reacción) y en ningún caso se observó actividad.

5.1.6 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VELOCIDADES MAXIMAS DE REACCION

Los resultados que aparecen en la tabla X, indican que la PNP es la que exhibe la mayor velocidad de reacción al actuar sobre la inosina y la guanosina, seguida de la GAH al desaminar la guanina.

En cuanto a la 5'N, que marcará la pauta degradativa (el de la primera etapa del catabolismo), exhibe la velocidad de reacción mayor con AMP. Ello indica que el recambio de los nucleótidos de adenina debe ser el más elevado y que se produce adenosina en mayor cantidad que la que puede ser transformada por la ADA (Tabla X). La probable acumulación de adenosina, permitirá su reincorporación al acervo nucleotídico por intervención de la adenosina quinasa cuya actividad depende de la concentración de ATP (Agarwal et al 1976, Smith et al 1977).

5.1.7 DISCUSION

Los resultados experimentales descritos, proporcionan algunos elementos de juicio para poder esquematizar una posible explicación con respecto al comportamiento de la vía catabólica del metabolismo general de las purinas.

Para mantener las máximas analogías con los sistemas "in vivo", las condiciones de experimentación han sido de pH 7,4 y de temperatura 37°C. En estas condiciones, se han determinado

TABLA X

ACTIVIDADES ESPECÍFICAS Y V DE LOS ENZIMAS ADA, GAH, 5'N, Y PNP EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA

Enzima	Substrato	Actividad específica $\left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min mg protefna}} \right)$	V $\left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min mg protefna}} \right)$
ADA	Adenosina	0,0080	0,0122
GAH	Guanina	0,0506	0,0539
5'N	AMP	0,0173	0,0214
PNP	Inosina	0,0521	0,1026

En la determinación de las actividades específicas, la concentración de cada substrato fué de 100 μM (Véase 5.1.6)

distintos parámetros cinéticos para cada uno de los enzimas estudiados. También se ha ensayado el efecto inhibitor de los intermediarios del metabolismo purínico. Con ello, se pueden establecer las condiciones cinéticas básicas del funcionamiento de cada sistema.

La ADA de cerebro de rata, para la cual se ha obtenido un valor de K_m de 56 μM con adenosina, muestra un comportamiento similar en otros órganos de otras especies, ya que en todos se encuentran unas K_m que varían entre 10 y 60 μM con adenosina (Hoagland y Fischer 1967, Chassy y Suhadolnik 1967, Ma y Fischer 1968, Simon et al 1970, Maguire y Sim 1971, Agarwal et al 1975 a, b; Tritsch y Rosenfeld 1976, Hamill y Tritsch 1976, Agarwal et al 1977, Arch y Newsholme 1978, Fonoll et al 1982). Así pues, la ADA tiene una elevada afinidad por su substrato adenosina. El enzima es inhibido por el producto de la reacción (inosina) de forma competitiva y con un valor de K_i de 570 μM , lo que indica que la afinidad del enzima para con la inosina es unas 10 veces menor (K_m/K_i) que para con el substrato. En cerebro de mono, la afinidad para con la inosina es siete veces menor (Tritsch y Rosenfeld 1976). Análogamente, el enzima es inhibido de forma competitiva por la guanosina y por la adenina, lo que concuerda con los estudios realizados con el enzima de eritrocitos humanos (Daddona y Kelley 1977).

Los restantes intermediarios del metabolismo no inhiben al enzima que tampoco parece sufrir inhibición por exceso de substrato (hasta 200 μM , dato acorde con Hoagland y Fischer -1967- en doudeno de pollo). Ello demuestra, a nivel metabólico, una regulación poco efectiva del enzima.

La GAH también tiene una elevada afinidad con su substrato guarina ($K_m = 6,8 \mu\text{M}$) y sólo es inhibido de forma competitiva por el producto de la reacción, la xantina ($K_i = 119 \mu\text{M}$). Los

valores de K_m del enzima de diversos orígenes oscilan entre 5 y 8 μM (Carraway 1966, Roy 1966, Mansoor et al 1963, Currie y Bray 1967, Bergstrom y Bieber 1978, Kumar et al 1972, Rossi et al 1978, Galilea et al 1981). Por su parte, para el enzima de hígado de bacalao, ni la hipoxantina ni la xantina son inhibidores (Roy y Roy 1967), mientras que para el de cerebro de cobaya, tanto la hipoxantina, como la xantina o al ácido úrico son inhibidores no competitivos (Martinez-Farnós et al 1978). No obstante, con los datos aportados en este trabajo, cabe esperar que el comportamiento del enzima "in vivo" sea el de desaminar de forma rápida (por su elevada V en la fracción soluble -tabla X-) la guanina transformándola en xantina. "In vivo" el posible efecto inhibitor de la xantina es poco probable pues se requerirían concentraciones de xantina cien veces superiores a las de guanina (1 μM) para una inhibición del 50 %.

La actividad de la 5'N de cerebro de rata, se pone de manifiesto incluso en ausencia del ión Mg (II) en el medio. La presencia del ión es imprescindible para la actividad 5'N de Bacillus subtilis K (Ozaki y Shio 1979), de hígado de pollo (Itoh et al 1978), de hígado de rata (Fritzson 1968) y de bacterias marinas (Ahlers et al 1978) entre otros orígenes. Sin embargo, otros autores han demostrado que la actividad de la 5'N de corazón de rata (Sullivan y Algers 1971), de glándula mamaria de rata (Chatterjee et al 1979), de linfocitos de cerdo (Dornand et al 1977, 1978), de células HeLa (Brake 1978), de cerebro de cordero (Ipata 1967, 1968) y de cerebro de buey (Mallol y Bozal 1982) no se modifica en presencia del ión Mg (II). La actividad del enzima solubilizado de membranas tiroideas de buey tampoco es dependiente del ión Mg (II) (Peeters et al 1981).

El enzima ha mostrado, con los substratos ensayados (AMP, IMP, GMP y XMP), un comportamiento estrictamente michaeliano. Se ha puesto de manifiesto que el orden relativo de velocidades máximas es el mismo que el de afinidades por el substrato (Tabla VIII). Bossman y Pike (1971) en cerebelo de rata encuentran que el orden de afinidades de substrato para la 5'N es AMP > GMP > IMP, mientras que en hígado de pollo, el orden de afinidad es muy distinto y el substrato más afin es el IMP, seguido de GMP y de AMP (Itoh et al 1978). En cuanto al XMP, que ha sido poco utilizado y del que no existe la K_m correspondiente para la 5'N de ningún órgano, se ha indicado una velocidad relativa del 31 % comparada con la del IMP, también en hígado de pollo (loc. cit.).

Respecto a las posibles inhibiciones, se confirma la ausencia de las mismas excepto por los productos de la reacción. El enzima de cerebro de rata es fuertemente inhibido por adenosina (que por defecto del método no se pudo estudiar cinéticamente, aunque como en los otros sistemas estudiados, cabe esperar que la inhibición sea de tipo competitivo). Estos datos se confirman en unos casos, ya que en placenta humana la adenosina es inhibidor competitivo ($K_i = 0,4$ mM) (Song y Bodansky 1966), al igual que en hígado de rata ($K_i = 0,8$ mM) (Nakamura 1976, Tanaka et al 1973). La inosina también inhibe competitivamente en placenta humana ($K_i = 3$ mM) (Song y Bodansky 1966) así como en hígado de pollo, y se muestra como el inhibidor por producto más potente en organismos uricotélicos (Itoh et al 1967) en los que el substrato más afin es el IMP.

En otros casos, con estudios más amplios, se demuestra que el enzima de cerebro de cordero no es inhibido por P_i , hipoxantina, guanina e inosina (Ipata 1967, 1968), mientras que, a veces, se habla de inhibiciones por mononucleótidos (Burger y Lowenstein 1975, Fox y Marchant 1976) y que no son tales

pues al ser substratos, los mononucleótidos se unen ineludiblemente al enzima; de ello resulta una inhibición ficticia si se ensaya la actividad para con otro substrato.

El enzima de diversos orígenes es modulado por di y trinucleótidos, principalmente por ATP, ADP y GTP (Ipata 1967, 1968; Murray y Friedrichs 1969, Burger y Lowenstein 1975, Fox y Marchant 1976, Van der Berghe 1977). Estos efectos no se estudian en este trabajo pues estos metabolitos no se pueden considerar intermediarios del metabolismo (fig 4). No obstante, es posible que debido a ello, el enzima ejerza una función de control del nivel de los distintos nucleótidos, si bien de forma distinta en animales ureotélicos que en uricotélicos. Así, el enzima contribuye al recambio de los nucleótidos de la célula, al producir nucleósidos que, bien pueden seguir la vía degradativa, o bien reincorporarse al acervo de nucleótidos vía nucleósido quinasas como ya se ha descrito para la adenosina (Agarwal et al 1976, Smith et al 1977).

El estudio de la PNP de cerebro de rata se puede abordar desde el punto de vista de cada uno de sus posibles substratos. El valor de K_m hallado para guanosina, 32 μM está en consonancia con el valor de 43,5 μM encontrado para la PNP de cerebro de buey (Lewis y Glantz 1976). El valor de K_m con inosina, 117 μM es superior al de 17 μM obtenido con el enzima de hígado de buey (Friedkin y Kalckar 1950) y más cercano a los valores que se indican para eritrocitos normales (58 - 67 μM) (Kim et al 1968 b; Sheen et al 1968, Agarwal y Parks 1971), para la célula vegetativa (46 μM) y para la espóra (70 μM) de Bacillus cereus (Gardner y Kornberg 1967, Gilpin y Sadoff 1971, Serra et al 1971). El valor estimado para la xantosina, 36 μM , no puede ser comparado pues no existe dato análogo en la bibliografía. Sin embargo, ateniéndonos a la tabla IX, se concluye la muy baja velocidad de reacción para con la xantosina, así como la

prácticamente nula con la adenosina, lo cual está en concordancia con los datos de Gardner y Kornberg (1967), resumidos en la tabla XI.

TABLA XI

VELOCIDADES RELATIVAS PARA CON LOS DISTINTOS SUBSTRATOS DE LA PNP DE Bacillus cereus (Gardner y Kornberg 1967)

Substrato	Célula vegetativa	Espora
INOSINA	100	100
DESOXI INOSINA	54	48
GUANOSINA	50	65
DESOXI GUANOSINA	53	46
ADENOSINA	0,5	0,5
XANTOSINA	0,5	0,5
OTROS	0,5	0,5

En cuanto a las inhibiciones, el enzima se combina tanto con guanina como con hipoxantina, que son los productos de los substratos más afines. La xantina (0,1 mM) no inhibe apreciablemente pero cabe esperar que también se combine con el enzima y el efecto sea cuantizable solamente a mayores concentraciones del inhibidor. Los restantes intermediarios no inhiben al enzima. La inhibición, de tipo competitivo, de guanina e hipoxantina, tiene unas K_i muy bajas y esto con independencia del substrato (Guanosina o inosina -véase tabla IX-). Las K_i son

comparables al valor de K_m del enzima con guanosina e incluso menores que la K_m con inosina (Tabla IX). Si se comparan estos datos con los que se conocen para el enzima de otras fuentes, se manifiesta la gran variabilidad genética del enzima. En médula ósea de conejo, ni la xantosina ni la guanosina inhiben ni son substratos del enzima (Yamada 1961); en Bacillus subtilis, tanto XMP como GMP inhiben de forma no competitiva, mientras que el AMP lo hace de forma cooperativa (Serra et al 1971); en Salmonella typhimurium y Escherichia coli, la adenina inhibe de forma no competitiva (Jensen 1976); en eritrocitos humanos, los resultados son más concordantes y tanto hipoxantina como xantina y guanina inhiben de forma competitiva, con unas K_i entre 10 y 40 μ M, mientras que la adenina tiene un efecto menos acusado, con una K_i de 6,6 mM (Krenitsky et al 1968 a y b).

Estas inhibiciones son ficticias, por el carácter netamente reversible de la reacción. Así, el hecho de que los valores de K_m con guanosina e inosina y los de K_i para guanina e hipoxantina sean del mismo orden de magnitud, implica que el enzima puede actuar en uno u otro sentido, según sean las concentraciones intracelulares de los metabolitos citados. Por su parte, la actuación del enzima con xantosina tendrá poco significado "in vivo" salvo en condiciones límite que impliquen una acumulación apreciable del nucleósido, lo cual es poco probable. En cualquier caso, el enzima actuará en su papel anabólico o catabólico dependiendo no solo de las concentraciones de guanosina, inosina, hipoxantina y guanina (y, ocasionalmente de xantosina), sino de los otros dos substratos necesarios: P_i para la vía catabólica, y R-1-P para la vía biosintética de nucleósidos. Por lo demás, el enzima será indiferente a los niveles de los demás intermediarios, lo que sugiere que la única regulación profunda para la PNP es la genética.

En cuanto a la poca o nula actividad de la xantina oxidasa que confirma los datos de Markley et al (1973), es de presumir que sea una constante en el cerebro de mamíferos, con un significado fisiológico aún oscuro. No obstante, se puede pensar en una posible toxicidad del ácido úrico en el cerebro, al igual que ocurre con las oxopurinas en el sistema nervioso, tal como se ha indicado por Rosenbloom et al (1967) y por Seegmiller (1976).

El estudio comparativo de las velocidades máximas de los enzimas estudiados que se especifica en la tabla X, permite emitir una hipótesis acerca de qué vía catabólica está más favorecida y cuál menos.

El enzima de la primera etapa del catabolismo, la 5'N, exhibe la velocidad de reacción mayor con AMP, lo que indica que el recambio de los nucleótidos de adenina debe ser el más elevado. Además, es posible una producción de adenosina mayor de la que puede ser convertida en inosina por la ADA (Tabla X). La probable acumulación de adenosina permitirá su reincorporación al acervo nucleotídico por intervención de la adenosina quinasa, cuya actividad depende de la concentración de ATP (Agarwal et al 1976, Smith et al 1977).

El carácter reversible de la reacción catalizada por la PNP y el que el sistema inosina - hipoxantina (fig 4) se halle desplazado hacia la formación de inosina ($K_i(\text{hipoxantina}) < K_m(\text{inosina})$), sugiere que pueda influir en la transformación de la adenosina en inosina, catalizada por la ADA. Al ser la inosina inhibidor por producto de la ADA, su concentración puede determinar que sea mayor la cantidad de adenosina recuperada por la vía de la adenosina quinasa.

Debido a la ausencia de actividad xantina oxidasa en el tejido cerebral de rata, el catabolismo de los nucleótidos de

hipoxantina conduce a su liberación y, por la intervención de la hipoxantin-guanin fosforibosil transferasa (HGPRT), se transformará en IMP (Adams et al 1971, Olsen y Milman 1978). Es probable que esta ruta constituya la fuente principal de este metabolito, ya que se ha demostrado que la síntesis "de novo" de los nucleótidos purínicos en el cerebro no es muy significativa (Howard et al 1970, Wong y Henderson 1972).

Por su parte, el catabolismo de los nucleótidos de guanina conduce a xantina. La guanina está situada en el penúltimo paso catabólico y puede recuperarse por intervención de la HGPRT, transformándose en GMP. Asimismo, la desaminación de la guanina por GAH la transformaría en xantina. Esta última no es susceptible de transformación en XMP por la vía de la fosforibosil transferasa, ya que no se ha encontrado un enzima que catalice eficientemente dicha reacción. Por tanto, hay que suponer que el exceso de xantina en cerebro se eliminará por difusión a la sangre y en el riñón se transformará en ácido úrico por la intervención de la xantina oxidasa presente en el tejido.

El XMP es solo un intermediario en la interconversión del IMP y GMP; por tanto, el catabolismo del XMP no se muestra sea significativo en correlación con las actividades reducidas que muestran la 5'N y la PNP en esta vía catabólica (Tablas VIII y IX).

La validez de las hipótesis aquí formuladas, basadas en experimentos "in vitro", es limitada ya que pueden intervenir mecanismos más complejos. Los resultados reseñados dependen también de los niveles celulares de P_i y de R-1-P que pueden modificar la etapa catalizada por la PNP. Por otra parte, el fosforibosil pirofosfato (PRPP), que es el cofactor de la HGPRT en la vía de recuperación (fig 4), puede desempeñar un papel similar.

5.2

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIGADAS A LOS
MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA

La presencia de enzimas del catabolismo purínico se ha puesto de manifiesto en fracciones subcelulares de diversos tejidos, entre ellos, la ADA y la GAH que se han considerado tradicionalmente como enzimas citosolubles (Jordan et al 1959, Kumar et al 1965, Mustafa y Tewari 1970, Pull y McIlwain 1974, Trams y Lauter 1975). La menor actividad exhibida por estas enzimas en las fracciones subcelulares, en comparación con otros enzimas citosolubles (LDH o MDH), que también se unen a las membranas celulares (Fernández - Santos 1978, Elduque et al 1982), ha determinado que haya sido poco estudiada su presencia en las mismas; tampoco se posee una idea clara de la naturaleza química de su unión. En el presente capítulo se ha pretendido efectuar la caracterización cualitativa y cuantitativa de la interacción de los enzimas LDH, MDH, ADA, GAH y PNP con las membranas microsomales del tejido cerebral de rata.

5.2.1

EFEECTO DE LOS MEDIOS DE LAVADO DE LOS MICRO-
SOMAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS ES-
TUDIADOS

A fin de poder comparar las actividades enzimáticas estudiadas, en los distintos medios de separación de la fracción microsomal, se han efectuado experimentos que pongan de manifiesto si la naturaleza del medio provoca variaciones significativas de la actividad de los enzimas en estudio.

La fracción soluble, obtenida como se describió en métodos (véase 4.3), se diluyó en el medio adecuado, a fin de que la actividad enzimática final de las disoluciones así preparadas

fuese análoga a la de los lavados. En las disoluciones enzimáticas así preparadas, se determinaron las actividades de los distintos enzimas: ADA, GAH, PNP, LDH y MDH. Como control se empleó una disolución enzimática preparada por dilución con el medio A (sacarosa 0,28M, tris 25 mM, EDTA 1 mM, HCl de pH 7,4).

La disolución de desoxicolato al 0,075 % (p/v) en A, no afectó a la actividad de los enzimas ADA, GAH, PNP, LDH y MDH, pero cuando la concentración de desoxicolato es superior (0,2 a 0,5 %) no es posible determinar las actividades ADA, GAH y PNP.

El fosfato sódico 50 mM, de pH 7,4 no afectó a la actividad de la ADA, la GAH, la LDH y la MDH, pero la actividad PNP aumentó un 33 % o un 16 % al añadir 2 ml o 1 ml, respectivamente de la disolución enzimática a la mezcla de reacción (3 ml totales).

Por su parte, el NaCl 0,15 M en A no afectó a la actividad de los enzimas ADA, GAH, PNP, LDH y MDH, pero sí lo hizo cuando la concentración final fué de 4 M en A, tal como se muestra en la tabla XII.

Las correcciones debidas a los efectos del medio de lavado para cada actividad enzimática, ya se han tenido en cuenta al expresar los resultados que se presentan posteriormente.

5.2.2

EFEECTO DE LAVADOS SUCESIVOS DE LOS MICROSOMAS CON MEDIOS DE DISTINTA FUERZA IONICA SOBRE LA LIBERACION DE LOS ENZIMAS ESTUDIADOS

Los microsomas obtenidos como se describió en métodos (véase 4.3) se sometieron a lavados sucesivos con medios en los

TABLA XII

MODIFICACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN ESTUDIO
 POR EL NaCl 4 M EN EL MEDIO A

Enzima	Control	Disolución enzimática añadida a la mezcla de reacción	
		1 ml	2 ml
LDH	100	100	100
MDH	100	100	96
ADA	100	96	52
GAH	100	92	70
PNP	100	18	10

La actividad se determinó como se describió en métodos (véase 4.21.1 y 4.21.3.1). La fracción soluble se diluyó de forma que en la disolución enzimática la concentración de NaCl fué 4 M. Como control se usó la fracción soluble diluida con el medio A. Volumen de la mezcla de reacción, 3 ml.

que varió la fuerza iónica. Los resultados se presentan en la tabla XIII. En ésta y en las siguientes, se toma como referencia la actividad de los enzimas en la fracción soluble expresada en $\mu\text{cat/g}$ tejido. Los resultados obtenidos en cada lavado se expresan en partes por 10.000 de actividad (μcat) liberada por los microsomas correspondientes a 1 g de tejido, respecto a la actividad, del enzima considerado, en la fracción soluble. Cuando en tablas sucesivas se expresan las actividades en pp 10.000, se toman como referencia las actividades de la fracción soluble obtenidas en el medio A y que se indican en la primera columna de la tabla XIII.

TABLA XIII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS , POR LAVADOS SUCESIVOS , DE LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA

Fracción soluble	1 ^{er} lavado en A	2 ^o en A	3 ^o en A	1 ^{er} lavado NaCl 0,15M	2 ^o lavado NaCl 0,15M	1 ^{er} lavado NaCl IM	1 ^{er} lavado en fosfato sódico 50mM, pH 7,4
µcat/g cerebro	pp 10.000	pp 10.000	pp 10.000	pp 10.000	pp 10.000	pp 10.000	pp 10.000
1,2 ± 0,3	LDH	453	22,0	4,1	1,6	1,6	10,4
2,2 ± 0,5	MDH	292	21,0	3,2	3,7	1,3	15,6
0,0016 ± 0,0005	ADA	242	8,9	1,1	0	0	3,1
0,014 ± 0,003	GAH	306	14,6	2,3	0	0	6,4
0,006 ± 0,001	PNP	295	18,9	2,3	0	0	4,0
Proteína							
	mg/g cerebro	1,74	0,29	0,12	0,14	0,06	0,24
							0,03

Los lavados fueron sucesivos y se trató el residuo del lavado anterior (105.000 x g, 90 min) con el medio de lavado que se especifica. La actividad se determinó en el sobrenadante de cada lavado.

Los valores, para cada lavado, se expresan en partes por 10.000 de actividad liberada por los microsomas correspondientes a 1 g de tejido respecto de la actividad de cada enzima en la fracción soluble expresada en µcat/g cerebro (columna del margen izquierdo). Los valores de las actividades en la fracción soluble sirven de referencia para los datos expresados en tablas sucesivas. Los valores de actividad para la fracción soluble han sido estimados con el 95 % de confianza.

Al tratar los microsomas con medios de mayor fuerza iónica (NaCl 0,15 o NaCl 1M), después de haber efectuado tres lavados sucesivos de los microsomas con el medio A, no se observa una liberación apreciable de los enzimas del catabolismo purínico (ADA, GAH y PNP) y lo mismo ocurre con la LDH y la MDH (Tabla XIII).

En el último lavado, efectuado con fosfato sódico 50 mM de pH 7,4, se libera una cantidad moderada de actividad de los enzimas estudiados, siendo mayor la correspondiente a la LDH y la MDH (Tabla XIII).

En los experimentos que se describen posteriormente, los microsomas sometidos a tres lavados sucesivos en el medio A, se denominarán "microsomas lavados". De los "microsomas lavados" ya no es posible conseguir una liberación apreciable de los enzimas estudiados con medios de NaCl de fuerza iónica superior a la del medio A (Tabla XIII).

5.2.3 EFEECTO DE LA SONICACION EN EL MEDIO A SOBRE LOS "MICROSOMAS LAVADOS"

Para estudiar la posible liberación de las actividades enzimáticas en estudio a partir de los "microsomas lavados", se sometieron éstos a sonicación en el medio A y a 18 micrones, por espacio de 90 s, en intervalos de 30 s alternados con períodos de reposo de 30 s. Los resultados se recogen en la tabla XIV en la que se observa que, en este tratamiento, todos los enzimas estudiados se liberan de forma apreciable.

TABLA XIV

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS POR SONICACION EN EL MEDIO A DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS" DE CEREBRO DE RATA

Enzima	Sonicado en A pp 10.000
LDH	44 \pm 3
MDH	33 \pm 2
ADA	35 \pm 2
GAH	37 \pm 1
PNP	42 \pm 1
Proteína mg/g tejido	0,35

Los microsomas, previamente lavados tres veces con el medio A ("microsomas lavados"), se sonicaron (18 micrones, 30 s por tres veces) en el medio A. Las actividades enzimáticas se determinaron en los sobrenadantes y se expresan en partes por 10.000 de actividad liberada por los microsomas correspondientes a 1 g de tejido, respecto a la actividad de cada enzima en la fracción soluble de cerebro (véase pie tabla XIII). Resultados promedio correspondientes a tres experimentos análogos.

5.2.4 EFECTO DE LA SONICACION EN DISTINTOS MEDIOS Y EN DESOXICOLATO SOBRE LOS "MICROSOMAS LAVADOS"

Los "microsomas lavados" se sonicaron de forma alternativa suspendidos en NaCl 0,15 M en A, en fosfato sódico 50 mM de

pH 7,4 y en desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. Los resultados que se muestran en la tabla XV se comparan con los obtenidos por sonicación en A (véase tabla XIV).

La sonicación en disolución 0,15 M de NaCl en A no liberó mayores actividades enzimáticas que la sonicación en A. Así, el medio A fué suficiente para anular las posibles interacciones electrostáticas entre los enzimas en estudio y las membranas microsomas.

La sonicación en presencia de fosfato sódico 50 mM de pH 7,4 libera mayor cantidad de actividades enzimáticas que la sonicación en A; pero es en el medio de desoxicolato 0,075 % en el que se observa la mayor liberación de los enzimas en estudio.

5.2.5 EFFECTO DEL DESOXICOLATO SOBRE LOS "MICROSOMAS LAVADOS" Y SOBRE LOS MICROSOMAS SONICADOS

Para comprobar el efecto que ejerce el detergente por sí solo, se efectuó un lavado de los "microsomas lavados" con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla XVI y demuestran que el detergente, es más eficaz que la sonicación en A, para conseguir la liberación enzimática.

Los resultados obtenidos al tratar con desoxicolato el residuo microsomal obtenido después de la sonicación en A de los "microsomas lavados" (Tabla XVII) ponen de manifiesto que los microsomas, aún liberan cantidades apreciables de los enzimas estudiados. La liberación, producida por el detergente, está comprendida entre un 60 y un 75 % de la producida en la sonicación anterior.

TABLA XV

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS, POR SONICACION EN DISTINTOS MEDIOS, DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS" DE CEREBRO DE RATA

Enzima	Sonicación en NaCl 0,15 M en A pp 10.000	Sonicación en fosfato sódico 50mM, pH 7,4 pp 10.000	Sonicación en desoxico - lato 0,075 % (p/v) en A pp 10.000
LDH	41 + 5	60 + 4	76 + 6
MDH	40 + 1	53 + 2	55 + 6
ADA	31 + 2	50 + 4	54 + 4
GAH	28 + 2	41 + 4	57 + 4
PNP	28 + 2	52 + 8	55 + 6
Proteína			
mg/g tejido	0,31	0,32	0,44

De los microsomas, previamente lavados tres veces con el medio A, se tomaron cuatro alícuotas. Tres de ellas se sonicaron (18 micrones, 30 s, tres veces) en A conteniendo NaCl 0,15 M, en fosfato sódico 50 mM de pH 7,4 y en desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. La cuarta se sonicó en A y los resultados vienen expresados en la Tabla XIV.

Las actividades enzimáticas se determinaron en las aguas de lavado (sobrenadantes) y se expresan en partes por 10.000 de la actividad liberada por los microsomas correspondientes a 1 g de tejido, respecto a la actividad de la fracción soluble de cerebro (Véase pie de tabla XIII). Resultados promedio correspondientes a dos experimentos.

TABLA XVI

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS POR TRATAMIENTO CON
DESOXICOLATO DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS" DE CEREBRO
DE RATA

Enzima	Desoxicolato 0,075 % (p/v) en A pp 10.000
LDH	86 ± 2
MDH	61 ± 1
ADA	70 ± 1
GAH	71 ± 1
PNP	83 ± 3
Proteína	0,30
mg/g tejido	

Los microsomas previamente lavados tres veces con el medio A ("microsomas lavados") se trataron con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. Las actividades se determinaron en el sobrenadante. los valores se expresan en partes por 10.000 de actividad liberada por los microsomas correspondientes a 1 g de tejido, respecto a la actividad de cada enzima en la fracción soluble (véase pie tabla XIII). Resultados promedio correspondientes a tres experimentos análogos.

TABLA XVII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS RELATIVAS LIBERADAS DE LOS MICRO-
SOMAS SONICADOS EN A Y TRATADOS POSTERIORMENTE CON DESO-
XICOLATO

Enzima	Sonicado en A	Desoxicolato 0,075 % en A
LDH	100	61 \pm 1
MDH	100	70 \pm 1
ADA	100	67 \pm 2
GAH	100	63 \pm 4
PNP	100	75 \pm 4
Proteína (mg/g tejido)	0,35	0,13

Los microsomas, previamente lavados tres veces con el medio A ("microsomas lavados"), se sonicaron en A y el residuo de los microsomas sonicados se trató con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. La actividad enzimática se determinó en el sobrenadante y se expresan los valores comparativos correspondientes a dos experimentos análogos. El valor 100 se asigna a las actividades liberadas en la sonicación.

5.2.6

EFECTO COMPARATIVO DEL DESOXICOLATO Y DE LA SONICACION A DISTINTOS INTERVALOS DE TIEMPO, SOBRE LOS "MICROSOMAS LAVADOS"

Para comprobar que las causas de la liberación enzimática de los "microsomos lavados" son distintas cuando se efectúa por sonicación o por tratamiento por desoxicolato, se realizó el siguiente experimento comparativo. Una alícuota de "microsomos lavados" se trató con desoxicolato 0,075 %; otras cuatro alícuotas se sonicaron suspendidas en A, aunque a distinto número de intervalos de 30 s, con períodos de reposo de 30 s. Los resultados se recogen en la tabla XVIII. En ella se observa que la mayor liberación de actividad se produjo al tratar los microsomos con el detergente. Con la sonicación, la liberación de las actividades enzimáticas fué progresiva con el tiempo aunque no alcanzó a la producida por el desoxicolato; sin embargo, la cantidad de proteína liberada por acción del detergente fué menor que la que se liberó en la sonicación durante 90 s (30 s por tres veces) y 150 s (30 s por cinco veces).

5.2.7

EFECTO DE CONCENTRACIONES ELEVADAS DE NaCl SOBRE LA LIBERACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIGADAS A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA

Para comparar los resultados anteriores con lo que ocurre al lavar la fracción microsomal de cerebro de rata con medios de fuerza iónica elevada, se han efectuado lavados de dicha fracción con disolución de NaCl 4 M en A. Los resultados se muestran en la tabla XIX. Después del primer lavado de los microsomos en la disolución de NaCl 4M en A, el segundo lava-

TABLA XVIII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS RELATIVAS LIBERADAS DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS", POR SONICACION A DISTINTOS INTERVALOS DE TIEMPO O POR TRATAMIENTO ALTERNATIVO CON DESOXICOLATO 0,075 %

Enzima	SONICACION EN A (30 s x 1)	SONICACION EN A (30 s x 2)	SONICACION EN A (30 s x 3)	SONICACION EN A (30 s x 5)	TRATAMIENTO CON DESOXICOLATO 0,075 %
LDH	24	36	52	62	100
MDH	29	43	54	59	100
ADA	23	29	50	62	100
GAH	23	34	51	58	100
PNP	26	38	51	58	100
Proteína	0,19	0,30	0,35	0,42	0,31
mg/g tejido					

De los microsomas, previamente lavados tres veces con el medio A, se tomaron cinco alícuotas. Cuatro de ellas se sonicaron (18 micrones) a distintos intervalos de tiempo (30 s una vez, dos veces, tres veces y cinco veces); la última se trató con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A.

Las actividades enzimáticas se determinaron en las aguas de lavado (sobrenadantes). Los resultados son comparativos y se asigna el valor 100 a las actividades enzimáticas liberadas por el detergente.

do con el medio A (sin NaCl) liberó mayores actividades enzimáticas que las que aparecieron cuando se efectuó el primer lavado con A. Además, estas actividades fueron superiores a las obtenidas cuando el segundo lavado se efectuó con la disolución salina (Tabla XIX a). La pérdida no fué debida a desnaturalización, ya que un tercer lavado con A liberó una cantidad de actividades enzimáticas que fué complementaria a las obtenidas en el segundo lavado con el NaCl 4 M en el medio A (Tabla XIX b).

Los microsomas no experimentaron ninguna modificación apreciable, respecto a su contenido enzimático, a causa del tratamiento con el medio de concentración salina elevada. Este extremo se comprobó al tratar con desoxicolato (0,075 %) los microsomas previamente lavados con A o con la disolución de NaCl 4 M en A. Los resultados de la tabla XIX c indican que la liberación de actividad fué similar después de ambos tratamientos.

5.2.8

EFFECTO DE CONCENTRACIONES ELEVADAS DE PROTEINA (BSA) SOBRE LAS ACTIVIDADES LDH Y MDH LIGADAS A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA

En un experimento análogo al reseñado en el apartado anterior, en lugar de utilizar una elevada concentración salina en los lavados, se añadió seroalbúmina bovina (BSA), 5 mg/ml en A, al medio de lavado, cantidad de proteína que es muy superior a la que aparece habitualmente en la fracción soluble o en lavados sucesivos de los microsomas. En éstos últimos, y por la razón comentada, no fué posible la determinación de las actividades ADA, GAH y PNP. La determinación de las actividades se llevó a cabo entre 248 y 265 nm (véase métodos -4.21.1.-), región del UV en la que las proteínas muestran una

TABLA XIX

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA AL LAVARLOS CON MEDIOS DE DIVERSA FUERZA IONICA

Los resultados se expresan en partes por 10.000 de actividad liberada de los microsomas correspondientes a 1 g de tejido, respecto a la actividad de cada enzima en la fracción soluble de cerebro (véase pie tabla XIII)

TABLA XIX a

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS, YA LAVADOS CON NaCl 4M o CON A, AL EFECTUAR UN SEGUNDO LAVADO CON A o CON NaCl 4M

Enzima	2º lavado en A (1 ^{er} lavado efectuado con A)	2º lavado en A (1 ^{er} lavado efectuado en NaCl 4M)	2º lavado en NaCl 4M (1 ^{er} lavado efectuado en NaCl 4M)
	pp 10.000	pp 10.000	pp 10.000
LDH	22 + 6	66 + 9	11
MDH	21 + 3	68 + 1	13
ADA	9 + 3	55 + 8	17
GAH	15 + 3	43 + 3	8
PNP	19 + 6	45 + 4	13
Proteína			
mg/g tejido	0,29	0,22	0,09

Alícuotas de microsomas, previamente lavados una vez con A conteniendo NaCl 4M o con A, se lavaron, de forma análoga, con A conteniendo NaCl 4M o con A. Las actividades enzimáticas se determinaron en el sobrenadante después de la ultracentrifugación correspondiente.

TABLA XIX c

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS POR ACCION DEL DESOXICOLATO DE LOS MICROSOMAS TRATADOS DOS VECES CONSECUTIVAS CON NaCl 4M o CON A

Enzima	Desoxicolato (1 ^{er} y 2 ^o en A) pp 10.000	Desoxicolato (1 ^{er} y 2 ^o en NaCl 4M) pp 10.000
--------	--	--

LDH	113	120
MDH	110	117
ADA	66	70
GAH	78	82
PNP	87	97

Proteína

mg/g tejido 0,33 0,12

Alícuotas de microsomas tratados con A conteniendo NaCl 4M o con A, y posteriormente lavados con A, se trataron de forma análoga con desoxicolato 0,075 % (p/v) en el medio A. Las actividades se determinaron en las aguas de lavado (sobrenadante de ultracentrifugación).

TABLA XIX b

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS, LAVADOS DOS VECES CON NaCl 4M o CON A, AL EFECTUAR UN TERCER LAVADO CON A

Enzima	3 ^{er} lavado en A (1 ^{er} y 2 ^o en A) pp 10.000	3 ^{er} lavado en A (1 ^{er} y 2 ^o en NaCl 4M) pp 10.000
--------	---	---

LDH	4	33
MDH	3	39
ADA	1	28
GAH	2	21
PNP	2	30

Proteína

mg/g tejido 0,12 0,15

Alícuotas de microsomas, previamente lavados por dos veces consecutivas con A conteniendo NaCl 4M o con A, se lavaron de forma análoga con A. Las actividades se determinaron en el sobrenadante de la ultracentrifugación (4 °C, 105.000 x g, 90 min, rotor 35 FA) correspondiente.

absorbancia elevada; este hecho no permitió la comparación de las actividades ADA, GAH y PNP liberadas en estas condiciones, con las que aparecen cuando la absorbancia es normal (entre 0 y 1 A), como fué habitual en el resto de los experimentos.

La fracción microsomal recién obtenida con la disolución de BSA en A se somete a un lavado y , a continuación , se efectúa un segundo lavado, con A o con BSA en A; los resultados se muestran en la tabla XX. En el caso de la LDH no se observaron diferencias en ambos lavados. Con la MDH, la actividad obtenida con el lavado realizado con BSA en A es menor que con el realizado con A, aunque la diferencia es poco significativa.

TABLA XX

ACTIVIDADES LDH Y MDH LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS, YA LAVADOS CON BSA, AL LAVARLOS CON BSA O CON A

Enzima	2ºlavado con BSA (5% en A) (1 ^{er} lavado efectuado con BSA)	2º lavado con A (1 ^{er} lavado efectuado con BSA)
LDH	100	100
MDH	81	100

Alícuotas de microsomas lavados una vez con BSA (5 mg/ml) en A, se trataron alternativamente con BSA en A, o con A. Las actividades enzimáticas se determinaron en los sobrenadantes. Los valores son comparativos y se da el valor 100 para la actividad enzimática extraída en el segundo lavado con A.

5.2.9

ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES LDH Y MDH
LIGADAS A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO
DE RATA

La diferenciación que se efectúa en estos apartados, entre LDH y MDH y los enzimas purínicos (ADA, GAH y PNP) se debe, en primer lugar, al distinto contenido de ambos grupos de enzimas en el cerebro. La actividad de las deshidrogenasas, aquí estudiadas, es muy superior a la del otro grupo de enzimas, tanto en la fracción soluble, como al considerar las actividades enzimáticas ligadas a los microsomas (véanse tablas XIII y XIV). Por ello, la determinación de la actividad de ambas deshidrogenasas se ve facilitada por su abundancia y por el hecho de que su medida se efectúa a 340 nm, longitud de onda a la que no absorben de forma apreciable las proteínas ni las suspensiones de partículas; ambos factores pueden interferir en la región UV a la que se miden las actividades de los demás enzimas estudiados.

5.2.9.1

EFECTO DE LA INCUBACION DE LOS MICROSOMAS
 CON LOS SUBSTRATOS DE LA LDH Y LA MDH

Se determinaron las actividades LDH y MDH de una suspensión de microsomas (MC) lavados dos veces con el medio A. Dos volúmenes de 0,1 ml de dicha suspensión se incubaron ($30 \pm 0,1$ °C, 5 min) con 2,9 ml de la mezcla de reactivos; piruvato y NADH, para la LDH, y oxalacetato y NADH, para la MDH. El volumen, 3 ml, y las concentraciones de substratos son análogos a los que se emplean en las determinaciones de actividad de tales enzimas (véase 4.21.3.1). Paralelamente se confeccionó un blanco con 0,1 ml de la suspensión y 2,9 ml de A, que se incubó de igual manera a $30 \pm 0,1$ °C, 5 min. Transcurrido el inter-

valo de incubación, se centrifugaron (50.000 r.p.m., 30 min, rotor 75 Ti) las suspensiones para separar los microsomas. En el sobrenadante se determinaron las actividades LDH y MDH, antes y después de pasar por una columna de Sephadex G-25 para eliminar los productos que aparecen en el transcurso de la reacción. Para la determinación de las actividades enzimáticas, se emplearon 2,5 ml del sobrenadante (filtrado o no por Sephadex G-25) y 0,5 ml de la mezcla de sustratos de la concentración adecuada. El sobrenadante se atemperó 5 min a $30 \pm 0,1$ °C antes de comenzar la reacción por adición de la mezcla de sustratos.

La LDH se comporta de modo diferente a la MDH (Tabla XXI). La actividad LDH liberada es análoga cuando se incuba con los sustratos o en presencia de A, pero es menor que la actividad exhibida por la suspensión de microsomas, que se determinó antes de la incubación. Por el contrario, la actividad MDH que se libera es mayor que la de la suspensión de los microsomas.

Es decir, en la incubación sólo se libera parte de la actividad LDH que poseían los microsomas. En cambio, con la MDH, no sólo se libera una actividad que equivale a la exhibida por la suspensión de los microsomas, sino que es incluso superior a ésta; el moderado incremento de actividad MDH que se observa puede sugerirse se deba a una desorganización de la estructura del enzima.

TABLA XXI

ACTIVIDADES LDH Y MDH LIBERADAS AL INCUBAR A 30 °C LOS
MICROSOMAS CON LOS SUBSTRATOS DE LOS RESPECTIVOS ENZIMAS

	Actividad de la suspensión de microsomas	Actividad del blanco . (In- cubado sin substratos)	Actividad del sobrenadante de ultracentrifugación (Tras la incubación)	
			Sin filtrar	Filtrado en Sephadex G-25.
LDH	100	81	80	82
MDH	100	76	128	130

Se determinaron las velocidades iniciales de reacción para la LDH y para la MDH, de una suspensión de MC lavados previamente dos veces con A. La actividad de la suspensión fué de 0,4 ncat/0,1 ml para la LDH y de 0,5 ncat/0,1 ml para la MDH. Las dos mezclas de reacción permanecieron 5 min a $30 \pm 0,1$ °C y se ultracentrifugaron a 2°C, 50.000 r.p.m., 30 min (rotor 75 Ti). El experimento se hizo por duplicado y tras la ultracentrifugación se determinaron las velocidades iniciales de reacción en los sobrenadantes, antes y después de ser filtrados por Sephadex G-25. Los valores son comparativos y se asigna el valor 100 a la actividad de los microsomas al comienzo de la incubación. El correspondiente blanco se efectuó incubando los MC con el medio A y midiendo la actividad en el sobrenadante después de ultracentrifugar.

5.2.9.2 EFECTO DE LAVADOS SUCESIVOS DE LOS MICROSO-
MAS CON DISOLUCIONES DE DESOXICOLATO Y DE
TRITON X-100

Con objeto de establecer el grado de unión de la LDH y la MDH, con las membranas de los microsomas, la fracción microsomal se sometió a lavados sucesivos con disoluciones de detergentes de concentración creciente.

Los microsomas de cerebro de rata, obtenidos por el método habitual (véase 4.3) se lavaron con el medio A. A continuación se sometieron a los siguientes tratamientos sucesivos: cuatro lavados con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A, dos lavados con desoxicolato 0,2 % (p/v) en A, un lavado con desoxicolato 0,5 % (p/v) en A y un lavado con tritón X-100 0,1 % (v/v) en A. Finalmente, el último residuo microsomal se lavó con el medio A.

La determinación de actividades LDH y MDH se efectuó tanto en la suspensión de los microsomas en el medio de lavado (Tabla XXII a) como en el sobrenadante obtenido después de separar los microsomas (Tabla XXII b). Para ello, de cada lavado (a partir del tercero efectuado con 20 ml de desoxicolato 0,075 %) se tomó 1 ml para su análisis y se continuaron los lavados en el orden indicado. Al expresar los resultados (Tablas XXII a y b) ya se ha tenido en cuenta la disminución de la cantidad de microsomas en los sucesivos lavados.

Al comparar las actividades en la suspensión y en el sobrenadante de cada lavado, se pone de manifiesto que en cada uno de los tratamientos con detergente aparece una actividad enzimática que no se había observado en el lavado anterior (Tabla XXII a y b). Además, siempre apareció una determinada cantidad de las actividades enzimáticas que sigue asociada con los microsomas aislados y que no se liberó en el sobrenadante de

TABLA XXII

ACTIVIDADES LDH Y MDH QUE EXHIBEN LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA POR LAVADOS SUCESIVOS CON

DETERGENTES

Los resultados se expresan en partes por 10.000 de actividad liberada por los microsomas correspondientes a 1 g de tejido respecto a la actividad de cada enzima en la fracción soluble expresada en $\mu\text{cat/g}$ cerebro (véase pie tabla XIII). Los lavados son sucesivos y se trató el residuo del lavado anterior con el medio de lavado que se especifica. Después de un primer lavado con el medio A, los restantes fueron: cuatro con desoxicolato 0,075 %, dos con desoxicolato 0,2 %, uno con desoxicolato 0,5 %, uno con tritón X-100 0,1 % (todos en A) y el último en A.

TABLA XXII a

ACTIVIDADES LDH Y MDH DE LA SUSPENSION DE MICROSOMAS DESPUES DE VARIOS LAVADOS SUCESIVOS CON DETERGENTES

Enzima	DESOXICOLATO 0,075 %			DESOXICOLATO 0,2 %		DESOXICOLATO 0,5 %	TRITON 0,1 %	
	3º	4º	1º	2º	Unico lavado	Unico lavado	Unico lavado	Unico lavado
LDH	37,90	10,12	14,40	3,76	3,13	3,24		0,15
MDH	67,50	20,20	28,50	5,86	4,78	3,56		0,25

La determinación de las actividades enzimáticas se llevó a cabo en la suspensión de microsomas en el medio de lavado correspondiente. Hasta el tercer lavado con desoxicolato 0,075 %, los lavados se efectuaron con 20 ml; posteriormente el volumen disminuyó 1 ml cada vez, el cual sirvió para la determinación de actividad de las suspensiones.

TABLA XXII b

ACTIVIDADES LDH Y MDH LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS DESPUES DE LAVADOS SUCESIVOS CON DETERGENTES

Enzima	DESOXICOLATO 0,075 %			DESOXICOLATO 0,2 %		DESOXICOLATO 0,5 %	TRITON 0,1 %	MEDIO A	
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	UNICO LAVADO	UNICO LAVADO	
LDH	172,30	42,80	32,30	3,68	9,83	1,51	0	2,29	0
MDH	219,30	63,00	41,06	9,19	22,32	2,11	0	3,28	0

La determinación de las actividades enzimáticas se llevó a cabo en el sobrenadante obtenido por ultracentrifugación (105.000 x g, 60 min, rotor 35 FA, 4°C) de la suspensión microsomal en el medio de lavado correspondiente.

cada lavado. Finalmente, se comprobó que después de someter a los microsomas a los mencionados lavados, la suspensión del residuo microsomal todavía exhibe actividades LDH y MDH residuales que, indudablemente, se hallan ligadas al mismo.

5.2.10

ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ADA, GAH Y PNP LIGADAS A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA

No fue posible efectuar la determinación de la medida en que los enzimas del metabolismo purínico, ADA, GAH y PNP están ligados a las membranas microsomales, ya que no se pudo realizar un experimento análogo al descrito para la LDH y la MDH. Ello se debe a que la ADA, GAH y PNP aparecen en menor proporción que la LDH y la MDH; además, las concentraciones elevadas de desoxicolato (0,2 y 0,5 %) impiden la determinación de sus actividades enzimáticas. Es posible que las concentraciones elevadas de este detergente iónico alteren la estructura de tales enzimas como lo hace el SDS (Singer 1974). Tampoco fue posible el uso alternativo del tritón X-100 (detergente no iónico), debido a que su absortividad molar es muy elevada en la región UV. Así, en el caso de los enzimas del catabolismo purínico fue preciso incubar, durante intervalos de tiempo prolongados, los microsomas, previamente tratados con desoxicolato y lavados con el medio A, con los substratos de cada uno de los enzimas considerados.

5.2.10.1

EFEECTO DE LAVADOS SUCESIVOS DE LOS MICROSO- MAS CON DISOLUCIONES DE DESOXICOLATO

La fracción microsomal de cerebro de rata se lavó a fondo con disoluciones de tensoactivos. Los lavados fueron sucesi-

vos y consistieron en un primer lavado con el medio A, tres lavados con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A, un lavado con desoxicolato 0,2 % (p/v) en A y un lavado con desoxicolato 0,5 % (p/v) en A. Finalmente, después de lavar con el medio A para eliminar restos del detergente, el residuo microsomal se suspendió en el medio A. Se tomaron porciones de la suspensión resultante que se incubaron con los substratos de la ADA, de la GAH y de la PNP, durante intervalos de tiempo prolongados.

Para la determinación de la actividad ADA, se incubaron ($30 \pm 0,1$ °C) 2,1 ml de la suspensión de microsomas, 0,3 ml de adenosina (1 mM) y 0,6 ml de disolución de fosfato sódico 200 mM de pH 7,4. Transcurrido el intervalo de tiempo de incubación (10 - 17,5 h), se centrifugó la suspensión (50.000 r.p.m, 30 min, rotor 75 Ti) para separar los microsomas. En el sobrenadante se determinó la cantidad de adenosina transformada en inosina; para ello, se añadieron 0,1 ml de PNP comercial (2,5 U/ml) y 0,1 ml de XO comercial (0,4 U/ml) a 2,5 ml del sobrenadante. Paralelamente se confeccionó un blanco en el que, en lugar de la suspensión, se añadieron 2,1 ml de A a la mezcla de incubación. A 2,5 ml del blanco se le añadieron 0,1 ml de PNP y 0,1 ml de XO comerciales. La diferencia de absorbancia a 293 nm, entre el incubado con la suspensión y el blanco, correspondió al ácido úrico formado a partir de la inosina por acción sucesiva de la PNP y la XO añadidas.

En la determinación de la actividad GAH, se incubaron ($30 \pm 0,1$ °C), 2,1 ml de la suspensión de microsomas, 0,3 ml de guanina (1 mM) y 0,6 ml de A. En este caso, transcurrido el tiempo de incubación (10 - 17,5 h) y después de separar los microsomas (50.000 r.p.m., 30 min, rotor 75 Ti), se determinó en el sobrenadante la xantina formada a partir de la guanina por la GAH. Para ello, se añadieron 0,1 ml de XO comercial (0,4 U/ml) a 2,5 ml del sobrenadante. Paralelamente se confeccionó un

blanco de forma análoga a la indicada para el caso de la ADA. La diferencia de absorbancia a 293 nm entre el incubado con la suspensión y el blanco correspondió al ácido úrico formado a partir de la xantina por acción de la XO añadida.

Para la determinación de la actividad PNP, se incubaron ($30 \pm 0,1$ °C) 2,1 ml de la suspensión de microsomas, 0,3 ml de inosina (1 mM) y 0,6 ml de fosfato sódico 0,2 M de pH 7,4. Transcurrido el intervalo de tiempo de incubación (10 - 17,5 h) y después de separar los microsomas (50.000 r.p.m., 30 min, rotor 75 Ti), se determinó en el sobrenadante la hipoxantina formada a partir de la inosina por la PNP. Se añadieron 0,1 ml de XO comercial (0,4 U/ml) a 2,5 ml de sobrenadante. Paralelamente, y de forma análoga a los dos casos anteriores, se confeccionó un blanco en el que se substituyó el volumen de la suspensión por 2,1 ml del medio A. La diferencia de absorbancia a 293 nm entre el incubado con la suspensión y el blanco, correspondió al ácido úrico formado a partir de la hipoxantina, por acción de la XO añadida.

Los controles que contienen los substratos (todos 0,1 mM) de la ADA (adenosina), de la GAH (guanina) y de la PNP (inosina), no experimentaron ninguna variación de absorbancia al ser incubados a $30 \pm 0,1$ °C, durante 24 h.

Los resultados obtenidos muestran que los residuos microsomales tratados con desoxicolato, exhiben, todavía, actividades correspondientes a la ADA, la GAH y la PNP; ello se ha demostrado por la transformación de los substratos respectivos en el curso de las incubaciones. La transformación provocada por la ADA corresponde a 0,267 nmol/h x g tejido, la GAH transforma 1,326 nmol/h x g tejido y la PNP 1,097 nmol/h x g tejido. Los experimentos se realizaron por duplicado y a dos intervalos de incubación distintos (10 y 17,5 h).

En los experimentos efectuados para demostrar la existencia de actividades GAH y PNP, se prosiguió la incubación después de separar los microsomas, durante un intervalo de tiempo igual al empleado en la incubación con la suspensión de los microsomas. Después de la separación de los microsomas, el sobrenadante solo exhibe el 40% de la actividad GAH y el 37% de la actividad PNP mostradas en las incubaciones de la suspensión de los microsomas. El decremento de actividad GAH y PNP observado en el sobrenadante, no parece sea debido a una disminución de la concentración de los substratos respectivos, ya que si fuese así las variaciones de actividad habrían sido mucho menores. No puede descartarse que la pérdida de actividad observada sea debida, al menos, parcialmente, a desnaturalización progresiva de los enzimas. En el caso de la ADA, no fue posible realizar un experimento similar, debido a la poca actividad que mostró este enzima y a que la XO comercial poseía una pequeña cantidad de actividad ADA.

5.2.11

CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LOS ENZIMAS DE LA FRACCION SOLUBLE Y DE LOS LIBERADOS DE LA FRACCION MICROSOMAL DE CEREBRO DE RATA

Los experimentos de caracterización electroforética de todos los enzimas estudiados se efectuaron para comprobar si los enzimas liberados de los "microsomas lavados" exhibían el mismo patrón isoenzimático que los de la fracción soluble.

Al examinar las preparaciones enzimáticas obtenidas por sonicación o por tratamiento con desoxicolato (0,075 %) de los "microsomas lavados", mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se aplicaron 0,3 ml de disolución como máximo.

La caracterización de la LDH y la MDH, se completó por electroforesis en tiras de acetato de celulosa y el volumen máximo aplicado fué de 25 μ l. Se efectuaron los experimentos de modo que las unidades aplicadas de cada uno de los enzimas fueran aproximadamente las mismas al estudiar la fracción soluble o la disolución obtenida a partir de la fracción microsomal lavada. Con objeto de igualar las actividades enzimáticas de las disoluciones obtenidas a partir de los "microsomas lavados" y de la fracción soluble, ésta se diluyó convenientemente con el tampón en que se efectuó la electroforesis (véase 4.10). En determinadas ocasiones, los sobrenadantes de sonicación de los microsomas, o de su tratamiento con desoxicolato, se filtraron a través de gel de Sephadex G-25 equilibrado con el tampón en el que se efectuó la electroforesis (véase 4.10).

Con fines comparativos , y de modo sistemático, se efectuaron electroforesis de mezclas de la fracción soluble y de disoluciones obtenidas de los "microsomas lavados" por sonicación o con tensoactivos. Los volúmenes de cada una de las disoluciones que se mezclaron contenían las mismas unidades del enzima en estudio.

5.2.11.1 ADENOSINA DESAMINASA (ADA)

La ADA, se determinó por electroforesis discontinua en gels de poliacrilamida. Las disoluciones contuvieron aproximadamente 0,0253 ncat/ml del enzima en cada una de las aplicaciones.

En la figura 7 se muestra la única banda que se obtuvo al examinar la fracción soluble, el sobrenadante obtenido por sonicación de los "microsomas lavados" y la mezcla de ambas disoluciones.

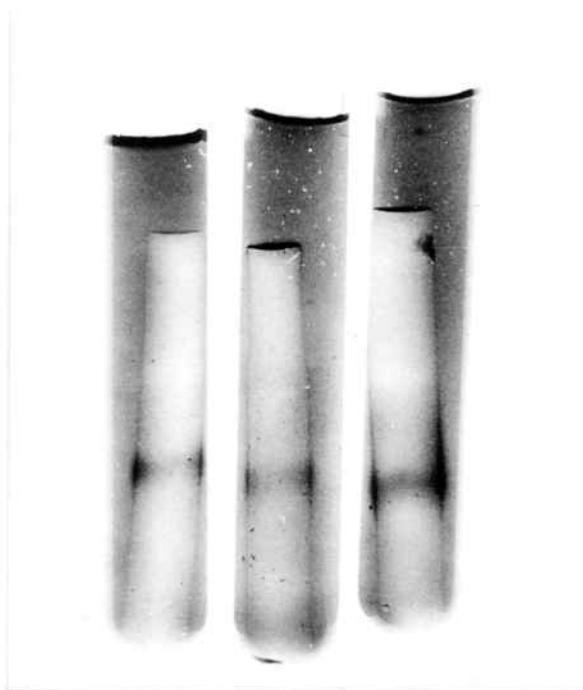


FIGURA 7.- ELECTROFORESIS DISCONTINUA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA ADA DE LA FRACCION SOLUBLE Y DE LA ADA LIBERADA POR SONICACION DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la ADA de la fracción soluble, de la ADA liberada por sonicación de los "microsomas lavados" y de la mezcla de ambas (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

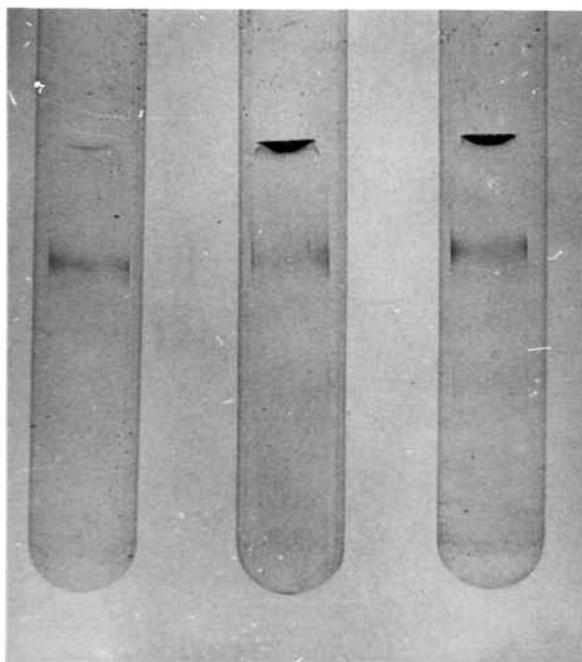


FIGURA 8.- ELECTROFORESIS DISCONTINUA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA PNP DE LA FRACCION SOLUBLE Y DE LA PNP LIBERADA POR SONICACION DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la PNP de la fracción soluble, de la PNP liberada por sonicación de los "microsomas lavados" y de la mezcla de ambas (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

5.2.11.2

GUANINA AMINOHIDROLASA (GAH)

La GAH se determinó por electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida. Las disoluciones contuvieron aproximadamente 0,1865 ncat/ml del enzima en cada uno de los preparados (fracción soluble, sobrenadante de sonicación de "microsomas lavados" y mezcla de ambos).

El revelado específico pone de manifiesto la existencia de una sólo banda, débil y ancha, de R_f 0,61, que no se distinguió en las fotografías efectuadas, en concordancia con lo indicado por otros autores (Galilea 1980).

5.2.11.3

PURINNUCLEOSIDO FOSFORILASA (PNP)

La PNP se sometió a electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida. Las disoluciones contuvieron aproximadamente 0,348 ncat/ml del enzima en cada uno de los preparados examinados. Solo aparece una banda (figura 8) con la fracción soluble y con el sobrenadante obtenido por sonicación de los "microsomas lavados", lo que corresponde a una sola forma enzimática como se pone de manifiesto en el ferograma de la mezcla de ambas fracciones.

5.2.11.4

LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

Las electroforesis de LDH se efectuaron en geles de poliacrilamida y en tiras de acetato de celulosa. En geles de poliacrilamida se efectuaron electroforesis zonales y discontinuas. Las disoluciones contuvieron aproximadamente 0,0087 μ cat/ml para cada uno de los preparados.

En la figura 9 a se muestran los ferogramas obtenidos por electroforesis zonal en geles de poliacrilamida, al examinar

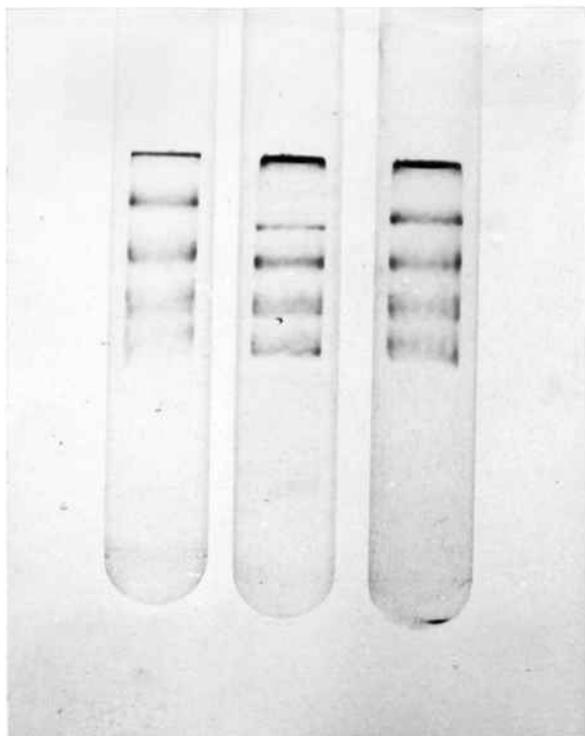


FIGURA 9 a.- ELECTROFORESIS ZONAL ANODICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA LDH DE LA FRACCION SOLUBLE Y DE LA LDH LIBERADA POR SONICACION DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la LDH de la fracción soluble, de la LDH liberada por sonicación de los "microsomas lavados" y de la mezcla de ambas (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

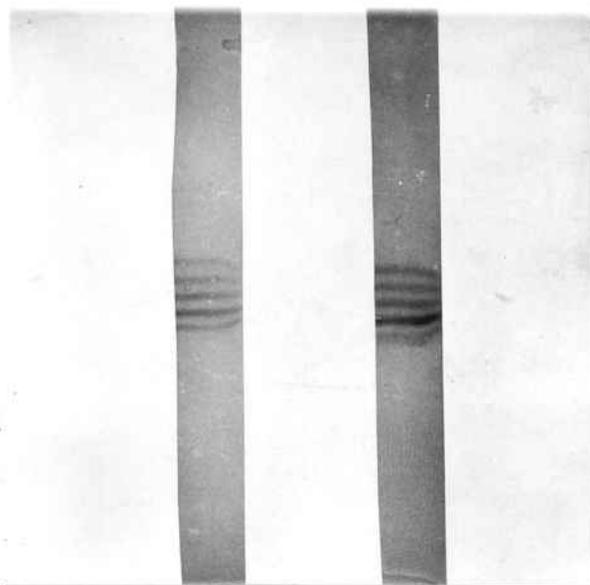


FIGURA 9 b.- ELECTROFORESIS EN TIRAS DE ACETATO DE CELULOSA DE LA LDH DE LA FRACCION SOLUBLE Y DE LA LDH LIBERADA POR SONICACION DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la LDH de la fracción soluble y de la LDH liberada de los "microsomas lavados" (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

la fracción soluble, el sobrenadante procedente de la sonicación en A de los "microsomas lavados" y la mezcla de ambos. Los preparados muestran cuatro bandas, por revelado específico, para las tres disoluciones estudiadas. Simon et al (1977) han descrito la aparición de cinco bandas al trabajar con el enzima del mismo origen, a pH 9,3. Al efectuar las electroforesis anteriores a pH 9,3 (tampón tris-glicina habitual), se obtienen también las cuatro bandas ya descritas (Figura 9 a). No obstante, al efectuar la electroforesis de las mismas muestras sobre tiras de acetato de celulosa, en los ferogramas aparecen cinco bandas (Figura 9 b). Ello es debido a que uno de los cinco isoenzimas de la LDH no penetra en los geles de poliacrilamida empleados en la electroforesis zonal y, en ella, una forma de la LDH emigra hacia el cátodo (véase 5.4.2.3.2.1 a).

Se efectuó, también, la electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida de muestras que procedían de los sobrenadantes obtenidos por sonicación de los "microsomas lavados" en distintos medios (véase 5.2.3 y 5.2.4). En todos los casos se obtuvieron cuatro bandas de LDH tanto si la sonicación se efectuó en A, o en NaCl 0,15 M en A, en desoxicolato 0,075% o en fosfato sódico 50 mM de pH 7,4 (Figura 10).

El sobrenadante obtenido después de la sonicación en A de los MC, tratados con desoxicolato (0,075 %) el residuo de MC sonicados y la mezcla de ambos sobrenadantes se sometieron a electroforesis zonal y en los ferogramas se observaron cuatro bandas. Se sometieron a sonicación los MC suspendidos en A y se separó el residuo y el sobrenadante como habitualmente (véase 4.8). El residuo anterior se suspendió en desoxicolato al 0,075% (p/v) en A y se obtuvo un nuevo sobrenadante. Se efectuó la electroforesis de zona de ambos sobrenadantes y de la mezcla de ambos, preparada mezclando volúmenes que

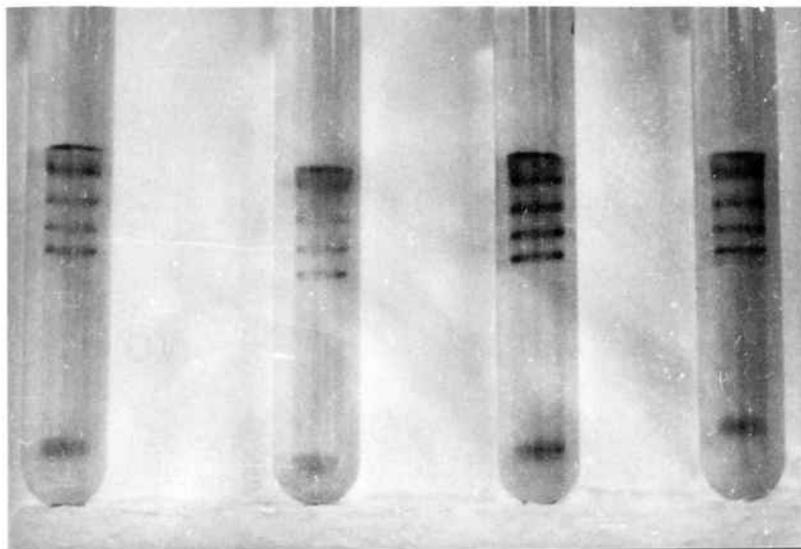


FIGURA 10.- ELECTROFORESIS DISCONTINUA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA LDH LIBERADA POR SONICACION EN DISTINTOS MEDIOS DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la LDH liberada por sonicación de los "microsomos lavados" en los siguientes medios: A, A conteniendo NaCl 0,15 M, desoxicolato 0,075 % (p/v) en A y en fosfato sódico 50 mM, pH 7,4 (de izquierda a derecha en el orden mencionado) .

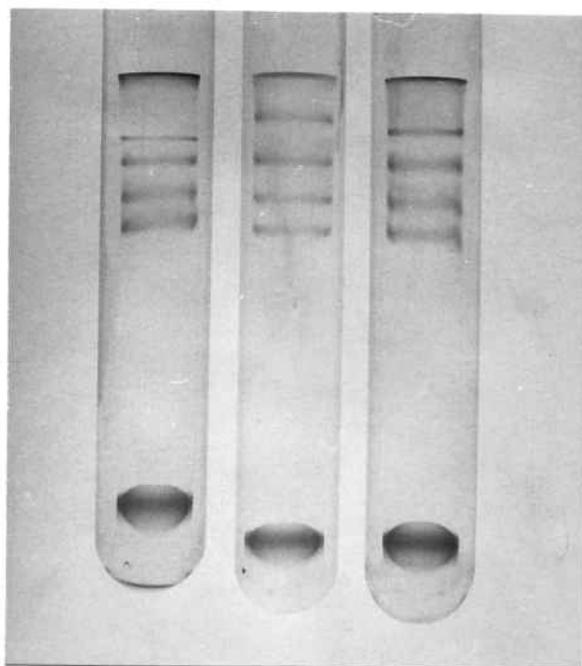


FIGURA 11.- ELECTROFORESIS ZONAL ANODICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA LDH LIBERADA POR SONICACION O POR TRATAMIENTO POSTERIOR CON DESOXICOLATO, DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico de la LDH liberada por sonicación en A de los "microsomos lavados", por tratamiento posterior con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A, o por mezcla de ambos (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

exhibieron actividades equivalentes. Todas las disoluciones muestran el mismo patrón electroforético y continúan apareciendo las mismas cuatro bandas. (Figura 11).

5.2.11.5 MALATO DESHIDROGENASA (MDH)

Las electroforesis efectuadas a fin de detectar la actividad MDH de las distintas muestras enzimáticas se llevaron a cabo paralelamente con las destinadas al estudio de la LDH (véase el apartado anterior 5.2.11.4); las disoluciones contuvieron aproximadamente 0,019 $\mu\text{cat/ml}$ de MDH.

En la figura 12 a se observa una sola banda con actividad MDH, que se pone de manifiesto en la fracción soluble, en el sobrenadante tras la sonicación en A de los "microsomas lavados" y la mezcla de ambos, tras una electroforesis zonal en geles de poliacrilamida.

Cuando la electroforesis se efectuó en tiras de acetato de celulosa, aparecieron dos bandas con actividad MDH (no coincidentes con las de actividad LDH) para las mismas muestras aplicadas en el caso anterior (Figura 12 b). Normalmente son dos las bandas de MDH obtenidas en la fracción soluble de distintos tejidos (Elduque 1980, Elduque et al 1982) y los resultados aquí obtenidos coinciden con las dos bandas de MDH que, por electroforesis zonal en geles de poliacrilamida, se obtienen en las fracciones soluble, mitocondrial y microsomal de hígado de rata (Berkes - Tomasevic y Hölzer 1967).

En la electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida solo aparece una banda con actividad MDH al examinar los sobrenadantes procedentes de la sonicación en distintos medios (A, disolución de NaCl 0,15 M en A, desoxicolato 0,075 % y fosfato sódico 50 mM de pH 7,4) de los "microsomas lavados"



FIGURA 12 a.- ELECTROFORESIS ZONAL ANODICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA MDH DE LA FRACCION SOLUBLE Y DE LA MDH LIBERADA POR SONICACION DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la MDH de la fracción soluble y de la MDH liberada por sonicación de los "microsomas lavados" (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

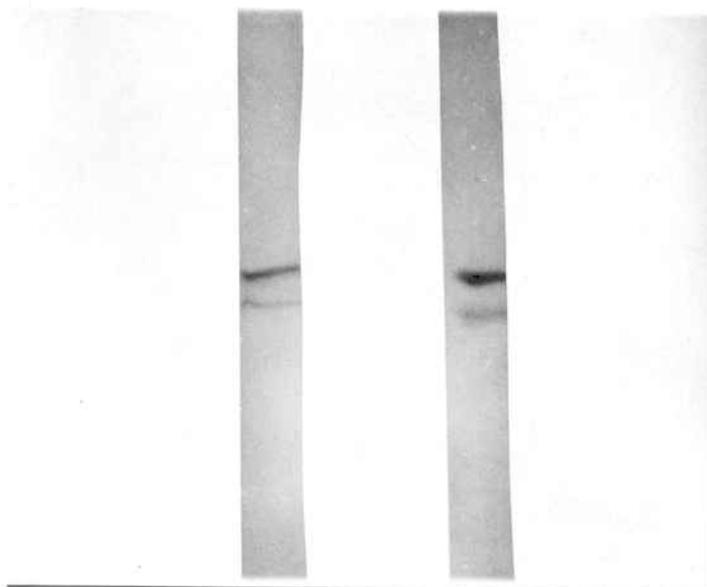


FIGURA 12 b.- ELECTROFORESIS EN TIRAS DE ACETATO DE CELULOSA DE LA MDH DE LA FRACCION SOLUBLE Y DE LA MDH LIBERADA POR SONICACION DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la MDH de la fracción soluble y de la MDH liberada por sonicación de los "microsomas lavados" (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

(Figura 13).

Por último, también se efectuó una electroforesis zonal en la que se aplicaron las muestras del sobrenadante obtenido tras sonicación en A de los MC, del tratamiento con desoxicolato 0,075 % del residuo de MC sonicados y de la mezcla de ambos. Los resultados coinciden con los anteriores obtenidos en geles de poliacrilamida, y solo aparece una banda de actividad MDH en todas las muestras (Figura 14).

5.2.12

EFEECTO DEL TRATAMIENTO DE LOS MICROSOMAS
DE CEREBRO DE RATA CON UN EXTRACTO HEPATICO
RICO EN XANTINA DESHIDROGENASA (XDH)

Se intentó demostrar si la liberación de enzimas que se produce a partir de los microsomas era debida a la ruptura de vesículas que durante la homogeneización hubieran ocluido cierta cantidad de los enzimas citosolubles en su interior. Para ello, se homogeneizó el tejido cerebral de rata con un extracto hepático de pollo cuya obtención se describió en métodos (véase 4.7). La elección del tejido hepático fue debida a que ésta contiene una elevada actividad de xantina deshidrogenasa (XDH) y a que este enzima está ausente en el tejido cerebral de rata.

5.2.12.1

OBTENCION DE LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE
RATA POR HOMOGENEIZACION CON UN EXTRACTO
HEPATICO ENRIQUECIDO EN XDH

Los cerebros de rata (25 g) se homogeneizaron con 165 ml del extracto hepático diluido 1::5 con el medio A. La separación de los microsomas se llevó a cabo en la forma habitual

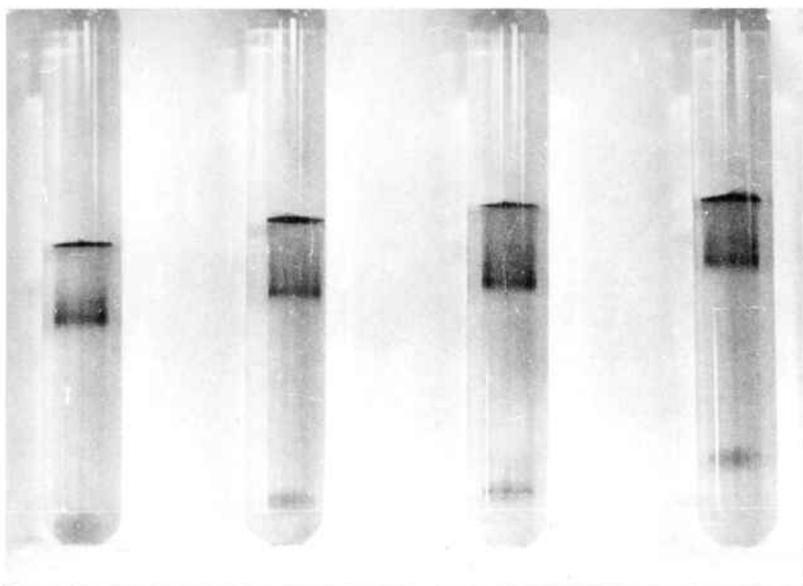


FIGURA 13.- ELECTROFORESIS DISCONTINUA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA MDH LIBERADA POR SONICACION EN DISTINTOS MEDIOS DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la MDH liberada por sonicación de los "microsomas lavados" en los siguientes medios: A, A conteniendo NaCl 0,15 M, desoxicolato 0,075 % (p/v) en A y en fosfato sódico 50 mM, pH 7,4 (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

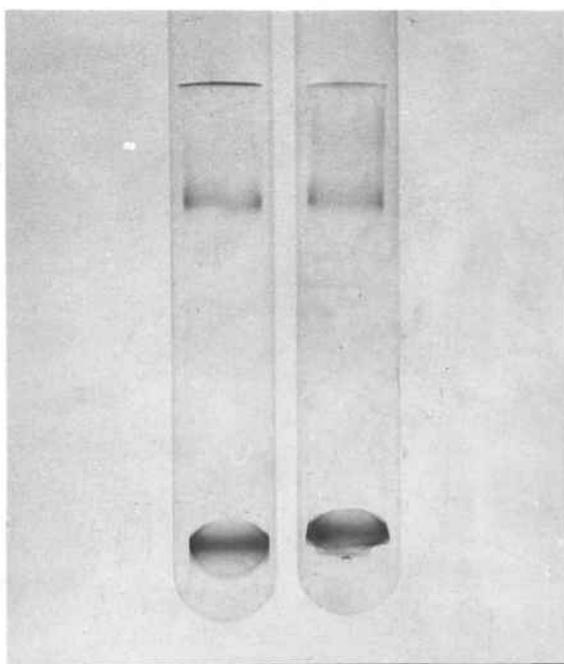


FIGURA 14.- ELECTROFORESIS ZONAL ANODICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA MDH LIBERADA POR SONICACION O POR TRATAMIENTO POSTERIOR CON DESOXICOLATO; DE LOS "MICROSOMAS LAVADOS".- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la MDH liberada por sonicación en A de los "microsomas lavados", y por tratamiento posterior con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

(véase 4.3).

Los microsomas obtenidos en presencia del extracto hepático se sometieron a cinco lavados sucesivos con el medio A; posteriormente, se sonicaron en el mismo medio y, por último, se trataron con desoxicolato. En todos los lavados se determinaron las actividades LDH, MDH, ADA, GAH, PNP y XDH. En los resultados se observa que todos los lavados dan lugar a liberación de XDH (Tabla XXIII).

5.2.12.2 OBTENCION DE LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA POR INCUBACION DEL SOBRENADANTE POST-MITOCONDRIAL CON UN EXTRACTO HEPATICO ENRIQUECIDO EN XDH

Con fines comparativos se efectuó un experimento en el que el extracto hepático se añadió al sobrenadante post-mitocondrial obtenido por homogeneización de los cerebros de rata con el medio A. La homogeneización de 27 g de cerebro se efectuó con 140 ml del medio A y en la forma habitual (véase 4.3). La suspensión se centrifugó (12.500 x g, 30 min a 4°C) y a 106 ml del sobrenadante post-mitocondrial, se añadieron 36,5 ml del extracto hepático obtenido como se describió en métodos (véase 4.7). El conjunto se mantuvo en agitación a 4°C durante 30 min, al cabo de los cuales se separaron los microsomas por ultracentrifugación (105.000 x g, 90 min, rotor 35 FA, a 4°C). Los microsomas fueron sometidos a los mismos lavados que en el experimento descrito en el apartado anterior. En la tabla XXIV se compara la actividad XDH que se libera en los lavados realizados en ambos experimentos; en todos ellos se libera actividad XDH. Los resultados de la sonicación y del tratamiento con desoxicolato son análogos y no aparecen valores muy elevados de actividad si se comparan con los obtenidos para

los demás enzimas en los experimentos descritos anteriormente (véase 5.2.4, 5.2.5, 5.2.6 y las tablas XIII - XVIII).

Los resultados comentados apoyan la hipótesis de que la XDH se une a las membranas microsomales, como ya se ha demostrado que ocurre en las membranas de los glóbulos grasos de la leche (Patton y Keenan 1975, Mather et al 1980). Ello explicaría su liberación en todos los lavados de los microsomas. Además, no parece ponerse de manifiesto que la XDH se incorpore al interior de las vesículas microsomales ya que la actividad liberada en los experimentos de sonicación hubiera sido más elevada. Por otra parte, si la XDH se hallase en el interior de los microsomas, la actividad liberada en la sonicación de los microsomas obtenidos por homogeneización con el extracto hepático, hubiese sido superior que la que se libera por sonicación de los microsomas obtenidos tras incubación del extracto hepático de pollo con el sobrenadante post-mitochondrial.

5.2.12.3 DISTINTO COMPORTAMIENTO DE LOS ENZIMAS ESTUDIADOS EN ESTOS EXPERIMENTOS

La suposición de que la XDH no se incorpora al interior de las vesículas microsomales se ve apoyada al considerar el comportamiento de los demás enzimas estudiados, en los experimentos realizados con el extracto hepático.

Al comparar las actividades de los enzimas LDH, MDH, ADA, GAH y PNP en la fracción soluble de cerebro de rata (Tabla XIII) y en la fracción análoga obtenida por homogeneización de los cerebros con el extracto de tejido hepático (Tabla XXIII) se observan algunas diferencias. La fracción soluble

TABLA XXIII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA SEPARADOS AL HOMOGENEIZAR EL TEJIDO
CON UN EXTRACTO DE HIGADO DE POLLO

Fracción soluble µcat/g cerebro	1 ^{er} Lavado en A pp 10.000	2 ^o en A pp 10.000	3 ^o en A pp 10.000	4 ^o en A pp 10.000	5 ^o en A pp.10.000	Sonicado en A pp 10.000	Desoxicolato pp 10.000
0,048	996	65	11	5	2	3	2
10,6	592	22	4	2	12	6	4
2,9	303	22	17	13	11	41	28
0,045	182	21	6	4	0	16	10
0,016	328	23	17	13	16	53	35
0,037	243	9	3	3	4	11	9

Los cerebros de rata se homogeneizaron con un extracto de tejido hepático de pollo (véase 4.7) y se aislaron los microsomas. Se efectuaron lavados sucesivos. El residuo del lavado anterior (105.000 x g, 90 min, rotor 35 FA, 4°C), se trató con el medio de lavado especificado. Las actividades se determinaron en las aguas de lavado (sobrenadantes); los valores se expresan en partes por 10.000 de actividad liberada por los microsomas correspondientes a 1 g de tejido, respecto a la actividad de cada enzima en la fracción soluble de la que proceden los microsomas (columna del margen izquierdo).

TABLA XXIV

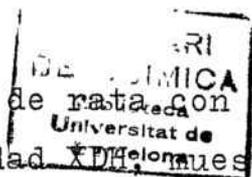
ACTIVIDAD XDH LIBERADA DE LOS MICROSOMAS AL HOMOGENEIZAR EL TEJIDO CEREBRAL CON UN EXTRACTO HEPATICO DE POLLO (a) ó AL INCUBAR EL SOBRENADANTE POST-MITOCONDRIAL DE CEREBRO DE RATA (b) CON EL EXTRACTO DE HIGADO DE POLLO

Tratamiento	Microsomas separados del homogeneizado preparado con un extracto hepático de pollo (a) pp 10.000	Microsomas separados del sobrenadante post-mitocondrial incubado con un extracto hepático de pollo (b) pp 10.000
1 ^{er} lavado en A	996	624
2º en A	65	60
3º en A	11	10
4º en A	5	7
5º en A	2	3
Sonicado en A	3	7
Desoxicolato		
0,075 %	2	4

La columna de la izquierda corresponde a los valores expresados en la tabla XXIII, que se comparan con los que corresponden a lavados análogos de los microsomas obtenidos al incubar el sobrenadante post-mitocondrial de cerebro de rata con un extracto de tejido hepático de pollo (véase 4.7). La incubación se efectuó a 4°C, 30 min y con agitación suave.

(a) Véase 5.2.12.1

(b) Véase 5.2.12.2



obtenida al homogeneizar los cerebros de rata con el extracto hepático, además de exhibir actividad LDH, muestra actividades LDH, ADA y PNP mayores que la fracción soluble de cerebro de rata obtenida del modo habitual; mientras que las actividades MDH y GAH, son similares a las de ésta última. Al comparar las actividades LDH, MDH, ADA, GAH y PNP liberadas en la sonicación de ambos tipos de microsomas (Tablas XIV y XXIII) se comprobó que las pp 10.000 de MDH y de GAH fueron análogas. Respecto a los demás enzimas, se observó que en los microsomas obtenidos después de la homogeneización con el extracto hepático, se hallaron en menor proporción expresada su actividad en pp 10.000. Los resultados reseñados sugieren que la presencia de actividades enzimáticas elevadas en el medio de homogeneización y en la fracción soluble, no dan lugar a que se produzcan incrementos de la actividad enzimática que se libera en la sonicación de la fracción microsomal previamente lavada con A.

5.2.13

DISCUSION

Los microsomas de cerebro de rata, después de lavados con el medio de homogeneización A, o con medios de fuerza iónica más elevada (NaCl 0,15 y NaCl 1M) todavía exhiben actividades LDH, MDH, ADA, GAH y PNP. Así ocurre con el residuo que queda después de sonicar la fracción microsomal lavada, o cuando esta se trata con desoxicolato (0,075 % en A) (Tablas XIV-XVI). Los resultados indican que las actividades enzimáticas ligadas a los microsomas se liberan de dos maneras diferentes; una al lavar la fracción microsomal con el medio A y otra por medio de tratamientos más enérgicos de los microsomas, como son la sonicación o el uso de detergentes.

Puede admitirse que los enzimas liberados de los microsomas en los lavados efectuados con A son los que se hallan unidos externamente a las membranas de los microsomas y pueden provenir, al menos parcialmente, de la fracción soluble, habiendo quedado retenidos en las membranas microsomales durante el proceso de aislamiento de la fracción. Tangen et al (1973) han demostrado que los microsomas de hígado de rata separados por filtración en gel de Sepharose 2B están menos contaminados por hemoglobina que los microsomas obtenidos por el método convencional de ultracentrifugación. No obstante, las formas moleculares de los enzimas estudiados que aparecen en la fracción soluble, o las que se liberan por sonicación o en el tratamiento con desoxicolato de los "microsomas lavados" son idénticas, como indican los ferogramas correspondientes.

También se ha puesto de manifiesto que, al tratar la fracción microsomal "lavada" con disoluciones de fuerza iónica creciente y superior a la del medio A, no se liberan cantidades apreciables de los enzimas estudiados, lo que indica que la fuerza iónica del medio A es suficiente para anular las interacciones de tipo electrostático entre los enzimas y las membranas microsomales intactas.

En los experimentos de extracción efectuados con los microsomas de cerebro de rata, todos los enzimas estudiados se comportaron de forma muy parecida. Los valores de actividad expresados en pp 10.000 respecto de las actividades extraídas de los "microsomas lavados", ya sea por sonicación o por tratamiento con desoxicolato, varían dentro de un margen limitado. El hecho es significativo ya que la LDH y la MDH son enzimas que se hallan en gran cantidad en el interior de la célula, mientras que la proporción de enzimas del catabolismo purínico, ADA, GAH y PNP, es mucho menor.

No obstante, en determinadas ocasiones, la MDH mostró desviaciones con respecto al comportamiento señalado para el resto de los enzimas. Así, se liberó en mayor cantidad al efectuar la sonicación de los microsomas en el medio A que contenía NaCl 0,15 M, que cuando se efectuó en el medio A (Tablas XIV-XV), lo que no ocurrió con los restantes enzimas. Lo mismo se observó al efectuar un segundo lavado de los microsomas con BSA, si se compara con el segundo lavado con A (Tabla XX). Por último, la incubación de los microsomas con sus substratos, oxalacetato y NADH, liberó mayor cantidad del enzima de la esperada; en efecto, la actividad medida después de la incubación con los substratos fue superior a la medida en la suspensión de microsomas, antes de la incubación con los substratos (Tabla XXI). Los resultados parece que dependen de la existencia de uno o más factores en los medios de lavado o de incubación (NaCl, BSA, substratos de la MDH) y pudieran estar relacionados, también, con la naturaleza de la MDH, la cual se encuentra ligada a las membranas mitocondriales (Sottocassa et al 1967, Comte y Gautheron 1978, Elduque et al 1982) e interacciona con los lípidos propios de la membrana (Comte y Gautheron 1978, Dodd 1973).

Weihing et al (1972) efectuaron diversas extracciones con disoluciones salinas en los microsomas de hígado de rata y los resultados concuerdan con los aquí obtenidos en lo que respecta a extracción de proteína. Los mismos autores (loc.cit.) han demostrado que las actividades enzimáticas liberadas de los microsomas lavados con desoxicolato 0,075 %, proceden, probablemente, del interior de las vesículas que componen la fracción. Esta concentración de detergente provoca una rotura suave de las vesículas y solo se consigue disolver entre un 10 y un 15 % de fosfolípidos; las concentraciones superiores del detergente desorganizan totalmente las membranas de los micro-

somas del tejido hepático y se consigue extraer el 80 % de los fosfolípidos de membrana, con el aumento correlativo en la solubilización de la glucosa - 6 - fosfatasa o la NADPH-citocromo c reductasa. No fué posible, en este trabajo, determinar las actividades de los enzimas del catabolismo purínico en presencia de desoxicolato del 0,2 o del 0,5 %. El detergente originó interferencias debidas, en parte, a la liberación de proteínas constituyentes de membrana y, en parte, quizás debidas a un efecto desnaturalizante del detergente, parecido al que ejerce el SDS (Singer 1974).

Las actividades enzimáticas liberadas por la sonicación de los microsomas deben proceder también de la rotura de las vesículas microsomales, como se ha demostrado que ocurre con los "microsomas rugosos" de hígado de rata (Svensson et al 1972); el método es enérgico y pueden producirse desnaturalizaciones debidas a la temperatura o a la cavitación en el curso de la operación (loc.cit.). En los resultados que se describen en este capítulo, la desnaturalización debida a estos dos factores no fué importante, ya que la sonicación en presencia de desoxicolato produjo una liberación de actividades enzimáticas análogas a las que aparecen en el tratamiento con desoxicolato. Ello se puso de manifiesto al comparar los valores obtenidos en los tratamientos de sonicación en el medio A o con desoxicolato (Tabla XV). Es posible que el desoxicolato ejerciera un efecto positivo en la solubilización de los enzimas por sonicación de los microsomas; no obstante, la cantidad de proteína extraída fue superior cuando se sonicaron los microsomas que cuando se trataron con desoxicolato. Por su parte, la MDH se comporta, una vez más, de forma diferente al resto de los enzimas ya que, aparentemente, no experimenta ningún tipo de desnaturalización térmica o por efecto de la cavitación, ni parece que el detergente efectúe ninguna ac-

ción positiva en su liberación de los microsomas por sonicación.

En el experimento realizado con la xantina deshidrogenasa presente en un extracto de tejido hepático de pollo, se demuestra que el contenido enzimático de los microsomas de cerebro de rata, varía muy poco aunque se efectúe la homogeneización del tejido cerebral de rata con un extracto que contiene grandes cantidades de alguno de los enzimas en estudio (Tabla XXIII). Sin embargo, también se demuestra que la XDH se une a las membranas microsomales, probablemente mediante interacciones de tipo hidrofóbico. La hipótesis está de acuerdo con el hecho de que un enzima análogo, la xantina oxidasa liberada por la glándula mamaria de vaca, es parte constituyente de la membrana de los glóbulos grasos de la secrección láctea (Patton y Keenan 1975, Mather et al 1980), y también con la formación de agregados de XDH de hígado de pollo (Bruguera 1982). Otro ejemplo de proteína con fragmentos hidrofóbicos que se une a las membranas microsomales de hígado lo constituye el citocromo b_5 (Strittmatter 1972). Los resultados obtenidos con disoluciones de elevada concentración salina sugieren que, en estas condiciones, se favorecen las uniones hidrófobas de los enzimas estudiados a las membranas microsomales. Aunque la sugerencia pudiera parecer inadecuada al tratarse de enzimas que habitualmente se han considerado como citosolubles, debe tenerse presente la existencia de manchas hidrofóbicas en todas las proteínas (Tanford 1973), lo que provoca que, en las cromatografías de interacción hidrofóbica, los enzimas se unan a los soportes en presencia de medios con concentraciones salinas elevadas (Yon 1972, Porath et al 1973, Hjerteen 1976, Pahlman et al 1977).

La caracterización electroforética de los enzimas liberados de los microsomas ha permitido establecer la identidad de las formas moleculares de los enzimas que aparecen en la fracción soluble. Con los enzimas del catabolismo purínico, ADA, GAH y PNP, se ha demostrado que solo se detecta una sola forma molecular presente en la fracción soluble y en los enzimas liberados de los microsomas.

El conjunto de resultados comentados demuestran que los microsomas de cerebro de rata pueden constituir un medio para el estudio del metabolismo cerebral, tanto si las vesículas microsomales están presentes en las vesículas cerebrales, como si se forman durante el proceso de homogeneización. La obtención de microsomas a partir de un extracto que se ha enriquecido en XDH, parece demostrar que las vesículas ya están presentes en la célula. No obstante, puede considerarse que tales vesículas se formen también durante el proceso, pero que no engloben en su interior porciones significativas del medio de homogeneización. En el primer caso, la importancia de los microsomas es obvia. Si lo que ocurre es que se forman tales vesículas durante el proceso, los resultados son concluyentes en cuanto a que se están aislando "in situ" locus celulares con identidad funcional propia. Por tanto, cualquiera que sea su origen, los microsomas se convierten en un medio adecuado para completar los resultados obtenidos con la fracción soluble respecto al catabolismo purínico en cerebro de rata, y quizás puedan emplearse en el estudio de otros metabolismos.

El estudio conjunto del catabolismo purínico utilizando microsomas, puede dar mejores resultados que el estudio individual de cada enzima en medios conteniendo mezclas de disolventes orgánicos. Tritsch (1974) y Tritsch et al (1976) han ideado métodos de estudio de la adenosina desaminasa en mez-

clas de agua y dioxano a fin de disponer de unos medios de reacción más próximos a los que el enzima puede actuar "in vivo"; en esta situación, un enzima en disolución en el citoplasma atraviesa gradientes amplios de constante dieléctrica y se desplaza de un lado a otro a partir de una porción lipídica de la membrana, especialmente si el enzima cataliza su reacción en la proximidad de las membranas celulares.

En estudios realizados en cerebro de roedores en 1959 por Jordan et al, se demostró la presencia de ADA y GAH en todas las fracciones subcelulares, aunque ambos enzimas se encontraban en mayor proporción en la fracción soluble citoplasmática (loc. cit., Pull y McIlwain 1974). No obstante, las actividades GAH (Kumar et al 1965) y ADA y también LDH (Pull y McIlwain 1974) aumentaron considerablemente al añadir tritón X-100 al medio de homogeneización. La LDH también se asocia a las membranas subcelulares, microsomales y submitocondriales de hígado de rata (Brdiczka et al 1973, Skilleter y Kun 1970); la MDH se asocia a la fracción submitocondrial "pesada" de hígado de rata (Sottocassa et al 1967) y a las fracciones submitocondriales de hígado de pollo (Elduque et al 1982).

A pesar de estos estudios y otros, en escasas ocasiones se ha profundizado en el estudio de la interacción de tales enzimas con las membranas de la célula. Aparte de los resultados ya discutidos, en el presente trabajo también se ha demostrado que los microsomas, después de tratamientos sucesivos con desoxicolato aún poseen actividades no solo de las deshidrogenasas LDH y MDH, tan abundantes en el interior de la célula, sino de ADA, GAH y PNP. No hay que descartar por tanto, que las posibles interacciones de tales enzimas con las membranas microsomales tengan un significado "in vivo". No se puede descartar que, en la célula intacta, las interac-

ciones hidrofóbicas entre enzimas y proteínas o lípidos de la membrana jueguen un papel importante. Ejemplo de ello son las proteínas de unión periplasmática (PBP) que se unen a proteínas constituyentes e intervienen en el transporte específico de metabolitos a través de las membranas celulares (Singer 1972, 1974). El transporte directo de compuestos purínicos a través de la membrana (Yamada 1961, Nakagawa y Gureff 1973, Lerner y Lowi 1974, Sixma et al 1976, Strauss et al 1976) o la existencia de receptores específicos de purinas (Berne 1963, Schrader et al 1977, Simmons 1981) puede efectuarse por proteínas específicas; así, se ha sugerido que la PNP actúa como transportador de nucleósidos a través de la membrana (Cohen y Martin 1977, Dowd et al 1977, Mura et al 1978) y que existe un transporte de hipoxantina y de guanina a través de la membrana de células cultivadas de mamífero que no está ligado a la HGPRT (Marz et al 1979).

En consecuencia y aunque algunas hipótesis sobre el significado fisiológico de las interacciones de los enzimas LDH, MDH, ADA, GAH y PNP se formularán en un capítulo posterior, se puede considerar que estos enzimas, al menos son proteínas de membrana de las denominadas "periféricas" en la clasificación de Singer (1972, 1974) (Tabla VI). Sin embargo, al considerar su comportamiento tras lavados a fondo de los microsomas con detergentes, incluso se podrían considerar proteínas constituyentes, si bien la concentración de detergente (desoxicolato) usada fué pequeña. Así, por el hecho de aparecer como unidos a la membrana y en la fracción soluble, de acuerdo con la hipótesis de Masters (1977, 1978 a y b), pueden considerarse como "ambicuos".

5.3

LOCALIZACION DE LOS ENZIMAS DEL METABOLISMO
PURINICO EN ENCEFALO DE RATA

Las actividades de los enzimas del catabolismo purínico, varían de un tejido a otro (Van der Weyden y Kelley 1976, Reis 1950, 1951; Galanti et al 1975, Adams y Harkness 1976) e incluso para la GAH (Mansoor et al 1963, Norstrant y Glantz 1965) y la 5'N (Scott 1967) se ha descrito una distribución desigual en el tejido cerebral. En el presente capítulo se investiga, de forma comparativa, la localización de los enzimas ADA, GAH, PNP y 5'N, así como de la LDH y la MDH, en el cerebro y en el cerebelo de rata. También se analiza el distinto comportamiento de tales enzimas en las fracciones microsomal y de vesículas sinápticas de tejido cerebral, así como en los sobrenadantes que se obtienen en los experimentos de "expresión del tejido".

5.3.1

EXPERIMENTOS DE "EXPRESION" DEL TEJIDO
CEREBRAL DE RATA

5.3.1.1

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS POR LA
"EXPRESION" DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATA

Se determinaron las actividades enzimáticas en el sobrenadante que se separa por "expresión" del tejido y se compararon con las que se obtuvieron en la fracción soluble de cerebro de rata obtenida después de homogeneizar el tejido mediante un homogeneizador de Potter-Elvehjem (véase 4.3). Las diferencias de actividad de los enzimas, mostradas por ambas disoluciones enzimáticas, son un indicio de la distinta localización de los enzimas en las células del complejo tejido cerebral de rata.

Los experimentos de "expresión" se efectuaron partiendo de dos muestras de 6 g de tejido, correspondientes a cuatro cerebros de rata, que se sometieron a ultracentrifugación prolongada, 21 h a 105.000 x g (rotor 35 FA, $r_{av} = 70$ mm). El sobrenadante que se separó se diluyó hasta 3 ml con el medio B, que fue análogo al medio A, pero sin EDTA. Se tomaron 2,5 ml de la disolución diluida y se filtraron a través de gel de Sephadex G-25 (véase 4.17.1) equilibrado con el medio B. En el filtrado se determinaron las actividades enzimáticas en estudio. Los resultados se muestran en la tabla XXV. En este experimento se determinó, también, la actividad 5'N ya que en el medio B se omitió la presencia del EDTA, el cual inhibe al enzima (véase 5.3.2.1).

Para comprobar estos resultados con los que se obtienen en la fracción soluble de cerebro de rata obtenida por homogeneización mediante un Potter-Elvehjem, fue preciso determinar si las actividades enzimáticas de la fracción soluble se modificaron cuando se sometía a una ultracentrifugación prolongada.

5.3.1.2 EFECTO DEL INTERVALO DE TIEMPO DE ULTRACENTRIFUGACION DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA, SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS SOBRENADANTES

Se tomaron muestras de 20 ml del sobrenadante post-mitocondrial separado después de la homogeneización del tejido (véase 4.3) y se ultracentrifugaron a 105.000 x g (rotor 35 FA) a distintos intervalos de tiempo. Se trabajó con los sobrenadantes que se separan después de ultracentrifugar 90 min, 4 h y 21 h, respectivamente, y en ellos se determinaron las acti-

TABLA XXV

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS POR "EXPRESION" DEL
TEJIDO CEREBRAL DE RATA

Enzima	Actividad $\mu\text{cat/g}$ tejido
LDH	$0,014 \pm 0,002$
MDH	$0,082 \pm 0,002$
ADA	$0,00024 \pm 0,00002$
GAH	$0,00014 \pm 0,00001$
PNP	$0,00072 \pm 0,00009$
5'N	$0,0000196 \pm 0,0000003$

Dos alícuotas de 6 g de cerebro se sometieron a "expresión" por espacio de 21 h (véase 4.6). El sobrenadante obtenido se diluyó hasta 3 ml con el medio B (sacarosa 0,28 M- tris 25 mM- HCl de pH 7,4); 2,5 ml se filtraron en gel de Sephadex G-25 equilibrado con el mismo tampón. Las actividades enzimáticas se determinaron en el filtrado y se expresan en $\mu\text{cat/g}$ de cerebro. Resultados promedio de dos experimentos.

vidades enzimáticas.

Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de todos los enzimas experimenta una disminución considerable después de 17 h de ultracentrifugación; la ADA fue el único enzima cuya actividad no disminuyó, prácticamente, en el transcurso de la ultracentrifugación prolongada (Tabla XXVI).

TABLA XXVI

VARIACION CON EL TIEMPO DE ULTRACENTRIFUGACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS OBTENIDAS EN LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA

Enzima	µcat/g tejido			
	1,5 h	4 h	17 h	21 h
LDH	1,2	1,2	0,38	0,23
MDH	2,2	2,2	2,0	1,52
ADA	0,0016	0,0015	0,0014	0,0013
GAH	0,014	0,013	0,0068	0,0041
PNP	0,006	0,006	0,004	0,003
5'N	0,00062	0,00045	0,00028	0,00024

Alícuotas de 20 ml del sobrenadante post-mitocondrial de cerebro de rata (12.500 x g, 30 min) del homogeneizado descrito en métodos (Véase 4.3), se ultracentrifugaron a 105.000 x g (rotor 35 FA) a distintos intervalos de tiempo. Las actividades enzimáticas se determinaron en los sobrenadantes tras 1,5; 4; 17 y 21 h de ultracentrifugación, después de filtrar por Sephadex G-25. Los resultados se expresan en µcat/g cerebro .

5.3.1.3 COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES LIBERADAS
EN LA FRACCION SOLUBLE Y EN LA "EXPRESION"
DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATA

En la tabla XXVII se comparan las actividades enzimáticas exhibidas por el sobrenadante de "expresión" de cerebro de rata y por la fracción soluble separada después de 1,5 h o 21 h de ultracentrifugación. Se pone de manifiesto que, la actividad de todos los enzimas estudiados en la fracción soluble, procedente de ambos experimentos, fué mayor que la que aparece en el sobrenadante de la "expresión". En la tabla XXVII se muestran unas diferencias muy acusadas cuando se comparan los resultados de la "expresión" con los de la fracción soluble separada por ultracentrifugación normal (1,5 h); sobre todo por lo que respecta a la LDH (relación 87 :: 1) y a la GAH (relación 88 :: 1). Las diferencias se reducen cuando se considera la fracción soluble que se separa después de una ultracentrifugación prolongada (21 h). No obstante, aun con la corrección efectuada por la modificación de la actividad, debida al intervalo de ultracentrifugación, los enzimas muestran unos comportamientos diferentes. Así, mientras que la GAH exhibe una relación elevada (actividad en la fracción soluble-21h frente a actividad en el jugo de "expresión") de 28 :: 1, los demás enzimas mostraron relaciones comprendidas entre 10 :: 1 y 20 :: 1, excepto la ADA cuya relación es menor, de 5,5 :: 1. Los resultados reseñados constituyen el indicio de una distinta localización de los enzimas en las células cerebrales, principalmente de la ADA. Aun cuando el rendimiento cuantitativo fue, para todos los enzimas, mayor en la fracción soluble obtenida por el método habitual (véase 4.3), la actividad ADA se liberó con más facilidad que el resto de los enzimas en los experimentos de "expresión".

TABLA XXVII

RELACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS EN LA FRACCION SOLUBLE Y EN LA "EXPRESSION" DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATA

Actividad fraccion soluble :: Actividad "expresion"						
	LDH	MDH	ADA	GAH	PNP	5'N
1,5 h(a)	87	27	7	98	32	32
21 h (a)	17	19	5	28	15	12

Se expresan los cocientes entre las actividades enzimáticas obtenidas en fracciones solubles al cabo de 1,5 y 21 h de ultracentrifugación (Véase tabla XXVI) y en la "expresión" durante 21 h del tejido cerebral de rata (Véase tabla XXV).

(a) El tiempo expresado se refiere al de ultracentrifugación de la fracción soluble correspondiente (véase tabla XXVI)

Los resultados referentes a la ADA sugiere la hipótesis, aún sin confirmar, de que sea un ectoenzima, al menos en parte y al igual que lo es la 5'N, como se ha demostrado que ocurre en cultivos de células cerebrales (Trams y Lauter 1975). Si ello fuese así, los resultados presentados aquí probarían que la ADA de la superficie celular se libera más fácilmente que la 5'N de idéntica localización en las células del tejido cerebral de rata.

5.3.2 DIFERENCIAS DE COMPORTAMIENTO DE LA ADA Y LA 5'N LIGADAS A LOS MICROSOMAS Y A LAS VESICULAS SINAPTICAS DE CEREBRO DE RATA

5.3.2.1 EFECTO DEL EDTA SOBRE LA ACTIVIDAD 5'N

Cuando se utilizó el medio A no fué posible la determinación de la actividad 5'N debido a la presencia del EDTA 1 mM, ya que el compuesto se ha demostrado que es un inhibidor irreversible del enzima de cerebro bovino (Mallol 1980, Mallol y Bozal 1982).

Por ello, al intentar determinar la actividad 5'N, paralelamente a la del resto de los enzimas estudiados, se empleó, como se ha indicado en el apartado anterior, el medio B, constituido de sacarosa 0,28 M y tris (25 mM) - HCl de pH 7,4.

5.3.2.2 DIFERENCIAS DE COMPORTAMIENTO DE LA ADA Y LA 5'N RESPECTO A LOS RESTANTES ENZIMAS, EN LA FRACCION MICROSOMAL DE CEREBRO DE RATA

Para demostrar el distinto comportamiento de la adenosina desaminasa y de la 5'Nucleotidasa respecto de los demás enzi-

TABLA XXVIII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS MICROSOMAS SUSPENDIDOS EN B, EN DESOXICOLATO O EN EL SOBRENADANTE DEL TRATAMIENTO CON DESOXICOLATO

Enzima	Suspensión de los MC en el tercer lavado con B	Suspensión de los MC en desoxicolato 0,075% (p/v) en B	Sobrenadante (Desoxicolato 0,075 % (p/v) en B)
LDH	28	196	86
MDH	43	244	90
ADA	877	750	70
GAH	101	339	71
PNP	69	188	83
5'N	12.980	10.700	171

Los microsomas se separaron en la forma habitual (véase 4.3), se lavaron tres veces con el medio B y se trataron con desoxicolato 0,075 %. De la suspensión en el tercer lavado con B y en desoxicolato se tomaron dos porciones para efectuar su análisis enzimático. Las actividades enzimáticas se han determinado en ambas suspensiones y en el sobrenadante del tratamiento con el detergente. Los valores de actividad se expresan en partes por 10.000 de actividad que exhiben los MC correspondientes a 1 g de tejido, respecto a la actividad de cada enzima en la fracción soluble de cerebro (véase pie tabla XIII). La actividad de la 5'N en la fracción soluble fue de 0,00085 μ cat/g. Los resultados se han corregido debido a la disminución de la cantidad de MC por el volumen de suspensión utilizado en el análisis enzimático.

mas en estudio, se han determinado cuantitativamente las actividades ligadas a los microsomas suspendidos en el medio B y en desoxicolato 0,075 % (p/v) en B.

Los microsomas, al igual que en experimentos anteriores, se lavaron tres veces con el medio B y a continuación se trataron con desoxicolato 0,075 %. Las actividades enzimáticas se determinaron en la suspensión de microsomas en el tercer lavado con el medio B, en la suspensión de microsomas tratados con desoxicolato y en el sobrenadante obtenido después de separar los microsomas de la suspensión anterior.

La determinación de las actividades ADA, GAH y PNP en la suspensión de microsomas requirió precauciones especiales. A la mezcla de reacción se le añadió un volumen (nunca superior a 0,2 ml) de la suspensión, de tal forma que la absorbancia a la longitud de onda del experimento, no fuera superior a 0,3 A, más la absorbancia normal de los substratos; las velocidades de trabajo del inscriptor fueron lentas. Para determinar las actividades LDH, MDH o 5'N en las suspensiones, no es preciso adoptar precauciones especiales.

Los resultados que muestra la tabla XXVIII indican, en primer lugar, que la 5'N es un enzima cuya presencia en los microsomas es comparativamente mucho más elevada (10.000 - 13.000 pp 10.000 respecto a la actividad en la fracción soluble) que la del resto de los enzimas cuya actividad se determina (200 - 800 pp 10.000 respecto a la actividad presente en la fracción soluble).

El tratamiento con desoxicolato 0,075 % mostró diferencias al comparar las actividades ADA y 5'N con la del resto de los enzimas. En efecto, en la suspensión en desoxicolato, las actividades de los enzimas LDH, MDH, GAH y PNP son superiores a las que mostraron en la suspensión en el medio B. El trata-

miento con el detergente revela la existencia de una actividad de estas enzimas que no se manifestaba cuando los microsomas estaban suspendidos en el medio B. Después de la separación de los MC presentes en la suspensión con el detergente, la cantidad que se libera de estas enzimas es considerable, pero la extracción no es completa; ya se ha descrito que después de efectuar lavados sucesivos de los microsomas con disoluciones de detergentes, los residuos microsomales conservan las actividades de todos los enzimas, si bien, considerablemente disminuidas (véase 5.2.10).

El mismo tratamiento con disolución de desoxicolato no dió lugar a la aparición de actividades ADA y 5'N diferentes a las que se manifestaron ya en la suspensión en el medio B. Además, en el sobrenadante separado después del tratamiento con desoxicolato, las actividades ADA y 5'N liberadas fueron escasas (1,6 % para la 5'N y 9,3 % para la ADA) si se comparan con las que se hallaron en las suspensiones de MC (tanto en el medio B como en desoxicolato 0,075 % en B).

Los resultados presentados indican que el comportamiento de la ADA y la 5'N es paralelo, y ambas se diferencian de los restantes enzimas estudiados. El hecho de que la 5'N se encuentre en elevada proporción en los MC y que toda su actividad se manifieste sin que sea necesario el tratamiento con detergente, se halla en concordancia con lo descrito para el enzima de otros tejidos de rata, que se localiza en la cara extracitoplasmática de las vesículas del interior de la célula (Stanley et al 1980). La 5'N se encuentra presente en los MC de hígado de rata (Benedetto et al 1979) y en el caso de las células de tejido nervioso humano en cultivo, se postula que la 5'N es un ectoenzima y que la ADA lo pueda ser también (Trams y Lauter 1975). La analogía de comportamiento exhibida por la ADA y la 5'N en los resultados aquí presentados parece

confirmar la hipótesis de que también la ADA sea un ectoenzima. Es un hecho de relevante interés el establecer que la ADA está localizada en la membrana y hacia la misma cara que la 5'N, que se considera como un enzima marcador de la membrana plasmática (Evans y Gurd 1973, Depierre y Karnovsky 1974 b, Trams y Lauter 1975, Brake et al 1978). La menor actividad relativa de la ADA, en comparación con la 5'N, en los microsomas de cerebro de rata y posiblemente de otras especies, no había permitido asignar esta localización concreta para la ADA en estudios anteriores .

5.3.2.3 PRESENCIA EN LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA DE LOS ENZIMAS NECESARIOS PARA EL CATABOLISMO DE LOS MONONUCLEOTIDOS PURINICOS

Como se ha puesto de manifiesto en el capítulo anterior, se ha demostrado que la ADA, la GAH y la PNP están ligadas a las membranas microsomales y lo mismo ocurre con la 5'N. Se ha tratado de comprobar si la presencia de estos enzimas permite a la fracción aislada, catalizar la transformación de los mononucleótidos purínicos hasta las bases púricas libres, hipoxantina y xantina; que son los productos finales del catabolismo de las purinas en el tejido cerebral, ya que éste no posee xantina oxidasa y, por tanto, estas bases púricas no se transforman hasta ácido úrico.

Los experimentos se llevaron a cabo efectuando incubaciones , análogas a las que se describieron en el capítulo anterior (véase 5.2.10.1), en presencia de AMP, GMP, IMP y XMP.

La fracción microsomal de cerebro de rata, obtenida en el medio B, se lavó con el medio B y, posteriormente, se trató

por dos veces consecutivas con desoxicolato 0,075 % (p/v) en el medio B. El residuo microsomal se lavó finalmente con el medio B y se volvió a suspender en el mismo medio. Alícuotas de esta suspensión, que contuvo 0,0092 U/ml de 5'N, fueron incubadas con AMP, IMP, GMP o IMP durante intervalos de tiempo prolongados.

Las muestras en incubación contenían 1,95 ml de la suspensión de MC, 0,75 ml de fosfato sódico 200 mM de pH 7,4 y 0,3 ml del mononucleótido correspondiente, AMP 1 mM o GMP, IMP y XMP, 2 mM, respectivamente. Las muestras control contenían 1,95 ml del medio B en lugar del volumen de la suspensión. Transcurrido el intervalo de incubación, a $30 \pm 0,1$ °C, se centrifugó la suspensión (50.000 r.p.m., 30 min, 4 °C, rotor 75 Tf) para separar los microsomas. En el sobrenadante se determinó la cantidad de hipoxantina o de xantina transformada en ácido úrico; para ello se añadieron 0,1 ml de xantina oxidasa comercial (0,4 U/ml) a 2,5 ml del sobrenadante. La diferencia de absorbancia a 293 nm entre el incubado con la suspensión y el blanco correspondió al ácido úrico formado. En los controles realizados con los mononucleótidos, éstos no experimentaron modificación al ser incubados a $30 \pm 0,1$ °C en el intervalo de tiempo de experimentación (4 h como máximo).

En todos los casos, excepto con XMP, se produjo conversión de los mononucleótidos en los productos finales del metabolismo (hipoxantina y xantina). Con AMP se produjeron 0,0020 μ mol ácido úrico/h, con GMP se produjeron 0,0186 μ mol ácido úrico/h y con IMP se produjeron 0,0194 μ mol ácido úrico/h. Los experimentos se realizaron por duplicado a dos intervalos de tiempo de incubación distintos (2 y 4 h).

Los resultados demostraron que los microsomas son capaces de catalizar la degradación de los mononucleótidos hasta am-

bas purinas por acción conjunta y sucesiva de los enzimas 5'N, ADA, PNP y GAH. El resultado obtenido con XMP sugiere que su catabolismo es muy lento, no obstante, el nivel de este nucleótido es muy bajo en la célula.

5.3.2.4 EFECTO DEL EDTA SOBRE LA 5'NUCLEOTIDASA LIGADA A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA

En un apartado anterior (véase 5.3.2.1) se ha discutido el hecho de que el EDTA 1 mM inhibe prácticamente un 100% a la 5'N de la fracción soluble de cerebro de rata. Cuando se separaron los microsomas en el medio A, por el método habitual (véase 4.3), la actividad 5'N de las suspensiones de microsomas era muy baja, no obstante, cuando estos microsomas obtenidos en el medio A, se sometieron a lavados sucesivos con el medio B (exento de EDTA), se fué recuperando la actividad 5'N de la suspensión de microsomas (Tabla XXIX). La inhibición por el agente es gradualmente reversible ya que disminuye al ir lavando los microsomas con medios exentos de EDTA; puede sugerirse, por tanto, que sea debida a interacciones de tipo hidrofóbico del EDTA con las membranas, o directamente sobre el enzima en el que, quizás, se produzca un cambio de conformación que impida el acoplamiento del substrato. Esta explicación está apoyada además, por el hecho de que la recuperación es gradual; otro tipo de interacciones, iónicas o por puentes de hidrógeno, permitirían una recuperación más rápida. Tampoco puede descartarse un complejamiento de algún ión metálico constitutivo de la proteína, por el EDTA, sin embargo, para la 5'N del tejido cerebral de buey se ha demostrado la ausencia de iones metálicos en la molécula proteica (Mallol y Bozal 1982 b).

TABLA XXIX

RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD 5'NUCLEOTIDASA DE LOS MICRO-SOMAS AL ELIMINAR EL EDTA DEL MEDIO

Suspensión de MC en A pp 10.000	1 ^a suspensión de MC en B pp 10.000	2 ^a suspensión de MC en B pp 10.000
740	2123	3900

Los microsomas se obtuvieron en la forma habitual (véase 4.3), en presencia de EDTA 1 mM (medio A). Los microsomas se suspendieron en el medio A y después de separarlos, se suspendieron dos veces consecutivas en el medio B (exento de EDTA). La actividad 5'N se ensayó en la suspensión de los microsomas en A y en las dos suspensiones posteriores en B. Los valores de actividad se expresan en pp 10.000 de actividad que exhiben los microsomas correspondientes a 1 g de tejido, respecto a la actividad de la 5'N en la fracción soluble (0,000855 μ cat/g tejido)

5.3.2.5 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CONCENTRACIONES ELEVADAS DE DETERGENTE EN LA UNION DE LA 5'N A LOS MICROSOMAS DE CEREBRO DE RATA

El tratamiento repetido de los microsomas con disoluciones de detergentes (desoxicolato y tritón X-100) de concentraciones crecientes, no condujo a la eliminación de las actividades LDH, MDH, ADA, GAH y PNP de los residuos de microsomas que se separan (véase 5.2.9 y 5.2.10). En un experimento aná-

logo se ha demostrado que la 5'N está fuertemente ligada a los microsomas de cerebro de rata y después de un tratamiento con desoxicolato 0,5 % (p/v) en B, el residuo separado aún contiene un 18 % de la actividad de la suspensión inicial de microsomas. Para la realización del experimento, se obtuvieron los microsomas en el medio B, el residuo se lavó tres veces con el medio B y después se sometió a dos lavados sucesivos con desoxicolato 0,075 % (p/v) en B. El residuo microsomal se suspendió en el medio B; en una parte se determinó la actividad 5'N y el resto se ultracentrifugó para recoger el residuo microsomal, que se sometió a dos lavados sucesivos con desoxicolato, uno con el detergente en concentración de 0,25 % y el otro 0,5 %. El residuo de microsomas así lavados, se lavó de nuevo con el medio B y el residuo final se suspendió en el medio B. Se determinó la actividad 5'N de las suspensiones de microsomas; los resultados se recogen en la tabla XXX a.

Cuando se determinó la actividad 5'N en la suspensión de microsomas en el detergente, se confeccionó una muestra control de la actividad 5'N de la fracción soluble frente a las mismas concentraciones de detergente. Con desoxicolato 0,075 % apenas se observa variación de la actividad 5'N respecto al control de actividad obtenido en ausencia del detergente (valor relativo 100). En desoxicolato 0,25 y 0,5 %, la actividad 5'N aumentó a 107 y 114 respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con la activación por desoxicolato descrita para el enzima de veneno de Crotalus atrox (Chatterjee 1979). En la tabla XXX a ya se han introducido las correcciones oportunas, que incluyen la activación de la 5'N y la pérdida cuantitativa de los microsomas de un lavado respecto del anterior; por tanto, los resultados que se presentan son comparables entre sí.

TABLA XXX

ACTIVIDADES 5'N, LDH, MDH Y GAH . LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS Y QUE EXHIBEN LAS SUSPENSIONES DE MICROSOMAS TRATADOS CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE DESOXICOLATO

Los microsomas separados en el medio B de la forma habitual (véase 4.3) se lavaron tres veces con el medio B. El residuo se trató dos veces sucesivas con desoxicolato 0,075% (p/v) en B. Los microsomas así tratados se suspendieron en B; se reservó una porción para el análisis enzimático, el nuevo residuo se lavó dos veces sucesivas con desoxicolato 0,25% (p/v) en B y 0,5 % (p/v) en B, respectivamente. El residuo final se suspendió en B. Las actividades enzimáticas se determinaron en los sobrenadantes, y en las suspensiones de microsomas. Los resultados se expresan en partes por 10.000 de actividad de los microsomas correspondientes a 1 g de tejido, respecto a la actividad de cada enzima en la fracción soluble de cerebro (véase pie tabla XIII). La actividad 5'N en la fracción soluble fue de 0,00085 µcat/g cerebro:

TABLA XXX a

ACTIVIDAD 5'N LIBERADA DE LOS MICROSOMAS Y QUE EXHIBEN LAS SUSPENSIONES DE MICROSOMAS TRATADOS CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE DESOXICOLATO

Desoxicolato 0,075 % en B		Desoxicolato	Desoxicolato	Suspensión de MC en B tras el lavado con desoxicolato 0,5 % en B
1 ^{er} lavado	2 ^o lavado	Suspensión de MC en B tras el 2 ^o lavado con desoxicolato	0,25 % en B	0,5 % en B
pp 10.000	pp 10.000	pp 10.000	pp 10.000	pp 10.000
178	146	6.182	2.101	2.184
				2.015

La actividad 5'N se determinó en los sobrenadantes de los lavados con el detergente y en la suspensión en B de los microsomas después del segundo lavado con desoxicolato 0,075 % (p/v) en B y del residuo final tratado con desoxicolato 0,5 % (p/v) en B.

TABLA XXX b

ACTIVIDADES LDH, MDH Y GAH LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS Y QUE EXHIBEN LAS SUSPENSIONES DE MICROSOMAS TRATADOS CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE DESOXICOLATO

Enzima	Suspensión de MC en B tras el 2º lavado con desoxicolato 0,075 % pp 10.000	Desoxicolato 0,25 % pp 10.000	Desoxicolato 0,5 % pp 10.000	Suspensión de MC en B tras el lavado con desoxicolato 0,5 % pp 10.000
LDH	3,7	51,0	8,4	0,6
MDH	12,8	83,0	27,0	1,4
GAH	45	-	-	7

Las actividades LDH y MDH se determinaron en los sobrenadantes de los tratamientos con desoxicolato 0,25 y 0,5 % y en la suspensión de microsomas en B, después del segundo lavado con desoxicolato 0,075 % y del residuo final tratado con desoxicolato 0,5 %. La actividad GAH solo se determinó en las suspensiones citadas ya que las concentraciones elevadas de desoxicolato (0,25 y 0,5 %) interfieren en su determinación de actividad.

En todas las suspensiones consideradas en la tabla XXX a, se determinaron las actividades LDH, MDH y, ocasionalmente, la GAH; los resultados se muestran en la tabla XXX b. Los restantes enzimas, ADA, GAH y PNP no se pudieron determinar debido a la elevada concentración del detergente (véase 5.2.10).

El comportamiento de la 5'N indica que el enzima se encuentra fuertemente ligado a los microsomas y que el tratamiento de éstos con concentraciones elevadas del detergente, no provoca un aumento de la actividad 5'N ligada a la suspensión de microsomas; con lo que se confirman los resultados presentados anteriormente (véase 5.3.2.2).

Las actividades LDH y MDH, en cambio, van aumentando a medida que los microsomas se tratan con concentraciones crecientes de desoxicolato. Así, tras dos tratamientos con desoxicolato 0,075 %, el tratamiento con desoxicolato 0,25 %, produjo una liberación considerable de tales enzimas, en concordancia con lo que se ha descrito precedentemente (véase 5.2.9).

5.3.2.6 DIFERENCIAS DE COMPORTAMIENTO DE LA ADA Y LA 5'N RESPECTO A LOS RESTANTES ENZIMAS EN LA FRACCION DE VESICULAS SINAPTICAS DE CEREBRO DE RATA

La hipótesis del nervio purinérgico de Burnstock (1972 a y b) se apoya, en parte, en la existencia en las células del tejido nervioso de enzimas como la 5'N y la ADA, que contribuyen a metabolizar el ATP a inosina; por ello, sería de interés el establecer la presencia de estos enzimas en las vesículas sinápticas aisladas de cerebro de rata. La obtención de una fracción de vesículas sinápticas fué posible mediante un sencillo método descrito por Soller et al (1973) y comentado en detalle en métodos (véase 4.5). La fracción de vesí-

culas sinápticas obtenida coincidió ampliamente con la obtenida por Soller et al (loc. cit.) como lo demuestran las imágenes que se obtuvieron en el microscopio electrónico; la fracción, al igual que la obtenida por estos autores, contuvo vesículas sinápticas (Figura 15) contaminadas por pequeñas vesículas de membrana de tamaño algo superior (Figura 16).

La fracción de vesículas sinápticas obtenida se lavó dos veces con el medio B y se trató con desoxicolato 0,075 % (p/v) en B; en el sobrenadante se determinaron las actividades LDH, MDH, ADA, GAH, PNP y 5'N. Las actividades 5'N, LDH y MDH también se determinaron en la suspensión de vesículas sinápticas. Los resultados se compararon con los obtenidos con los microsomas tratados de igual manera. Los microsomas, en este caso, no correspondieron a la misma fracción que la descrita en métodos (véase 4.3) y fué cuantitativamente algo superior. En el método de Soller et al (1973), la obtención del sobrenadante post-mitocondrial se lleva a cabo por centrifugación a 12.000 x g, 20 min. También, el medio de homogeneización fue de sacarosa 0,32 M y con una relación 10 ml/g de tejido. Los lavados, tanto de la fracción microsomal como de la de vesículas sinápticas, una vez aisladas, se efectuaron con el medio B.

La comparación de los resultados obtenidos en ambas fracciones se resumen en la tabla XXXI. Lo más destacable es el hecho de la elevada proporción de 5'N (12,3 %) y sobre todo, de ADA (29,7 %), con respecto a los restantes enzimas, en la fracción de vesículas sinápticas. Ello sugiere que las purinas puedan desempeñar una papel relevante en la función de las células del sistema nervioso central (SNC) y constituir un apoyo a la hipótesis de la existencia de terminaciones nerviosas purinérgicas en tal tejido (Burnstock 1975 b).

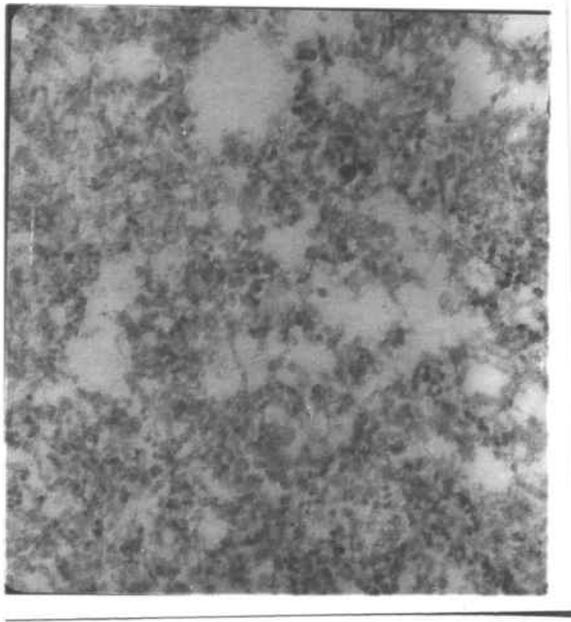


FIGURA 15.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA FRACCION DE VESICULAS SINAPTICAS OBTENIDA COMO SE DESCRIBIO EN METODOS (Véase 4.5).- La fracción se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23). 46.000 X.

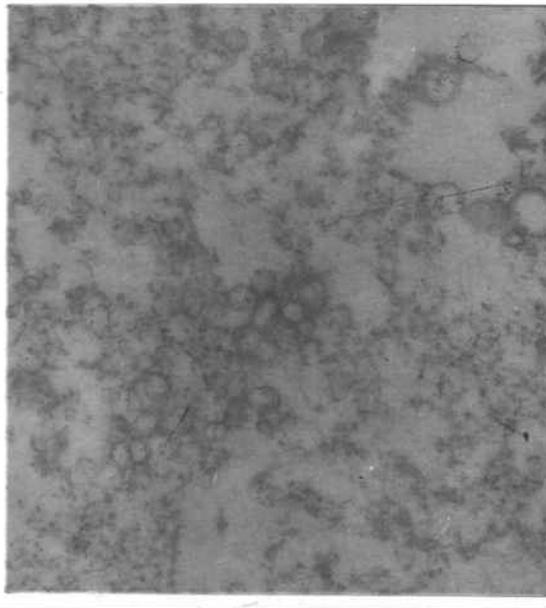


FIGURA 16.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA FRACCION DE VESICULAS SINAPTICAS OBTENIDA COMO SE DESCRIBIO EN METODOS (Véase 4.5).- La fracción se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23). 27.000 X.

TABLA XXXI

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS Y DE
LAS VESICULAS SINAPTICAS DE CEREBRO DE RATA

Enzima	Vesículas sinápticas	Microsomas
LDH	2,5	100
MDH	2,5	100
ADA	29,7	100
GAH	2,5	100
PNP	0,9	100
5'N	12,3	100

La fracción microsomal (véase 4.5) se lavó tres veces con el medio B y la fracción de vesículas sinápticas (véase 4.5) se lavó dos veces con el medio B después de su obtención. Ambas fracciones lavadas se trataron con desoxicolato 0,075 % (p/v) en B. Las actividades enzimáticas se determinaron en los sobrenadantes respectivos de los tratamientos con el detergente. Los resultados son comparativos; se da el valor 100 a la actividad de cada enzima liberada de la fracción microsomal.

La tabla XXXII muestra la comparación de las actividades LDH, MDH y 5'N, así como de las absorciones a 280 nm entre las fracciones de vesículas sinápticas y de microsomas. Estos resultados, además de confirmar los presentados en la tabla XXXI, demuestran que la LDH y la MDH se liberan, o están ligadas de forma distinta a las membranas de ambas fracciones.

5.3.3 COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN CEREBRO Y EN CEREBELO DE RATA

La importancia del papel de las purinas en el tejido nervioso (Burnstock 1972 a y b, 1975 a y b), que ha conducido a formular la hipótesis del nervio purinérgico, sugiere la posibilidad de que la actividad de los enzimas del catabolismo purínico varíe en las diferentes regiones del tejido nervioso en estudio. Ello ha conducido a efectuar experimentos comparativos en el tejido cerebral y cerebelar de rata.

5.3.3.1 COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO Y DE CEREBELO DE RATA

La fracción soluble de ambos tejidos se obtuvo de la forma habitual (véase 4.3 y 4.4). En la tabla XXXIII se muestran las actividades enzimáticas que se obtuvieron para ambos tejidos. La fracción soluble destinada a la determinación de las actividades LDH, MDH, ADA, GAH y PNP, se obtuvo por homogeneización en el medio A, en el que también se determinaron las actividades. Para la 5'N se trabajó exclusivamente con el medio B.

TABLA XXXII

ACTIVIDADES LDH, MDH Y 5'N Y ABSORBANCIA A 280 nm DE LAS SUSPENSIONES DE MICROSOMAS Y DE VESICULAS SINAPTICAS DE CEREBRO DE RATA

	Suspensión de MC en el tercer lavado en B	Suspensión de las vesículas sinápticas en el segundo lavado en B	Suspensión de MC en desoxicolato 0,075% (p/v) en B	Suspensión de las vesículas sinápticas en desoxicolato 0,075 %
LDH	100	2,7	100	1,3
MDH	100	2,9	100	1,3
A (280 nm)	100	2,8	100	3,3
5'N	100	11,8	100	9,7

Las actividades enzimáticas LDH, MDH, 5'N y la absorción a 280 nm se determinaron en las fracciones microsomal y de vesículas sinápticas, en las suspensiones respectivas en el último lavado con B y la posterior en desoxicolato 0,075% (p/v) en B. Los resultados son comparativos; se asigna el valor 100 a la actividad o a la absorción correspondiente a la suspensión de microsomas, en el medio B, o en desoxicolato 0,075 %.

TABLA XXXIIIACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO
Y DE CEREBELO DE RATA

Enzima	TEJIDO CEREBRAL ($\mu\text{cat/g}$)	TEJIDO CEREBELAR ($\mu\text{cat/g}$)
LDH	(8) $1,2 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$ (4)
MDH	(8) $2,2 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,3$ (4)
ADA	(8) $0,0016 \pm 0,0005$	$0,0013 \pm 0,0003$ (4)
GAH	(8) $0,014 \pm 0,003$	$0,0017 \pm 0,0004$ (4)
PNP	(8) $0,023 \pm 0,008$	$0,016 \pm 0,002$ (4)
5'N	(3) $0,0009 \pm 0,0002$	$0,0010 \pm 0,0002$ (3)

La fracción soluble de cerebro y de cerebelo de rata se obtuvieron como se describió en métodos (véase 4.3 y 4.4). La actividad se determinó en el sobrenadante de ultracentrifugación, después de eliminar los microsomas. La eliminación de substratos endógenos se llevó a cabo por filtración en gel de Sephadex G-25. La determinación de la actividad 5'N, en todo el proceso, se efectuó con el medio B, incluyendo la obtención de la fracción soluble; en los demás casos se usó el medio B. Los resultados se expresan en $\mu\text{cat/g}$ de tejido y, entre paréntesis, se indica el número de experimentos.

El hecho más representativo, que se pone de manifiesto al consultar la tabla XXXIII, es la analogía de actividades para LDH, MDH, ADA, PNP y 5'N en las fracciones solubles de cerebro y cerebelo; las actividades no son idénticas, pero exhi-

ben el mismo orden de magnitud y, a menudo, unas y otras coinciden dentro del margen de error de los resultados. Por su parte, la actividad GAH está muy disminuida en la fracción soluble de cerebelo de rata, unas diez veces inferior a la obtenida en la fracción soluble de cerebro de rata. Este hecho, del que no se puede aventurar ninguna hipótesis sin la realización de estudios más amplios, ya ha sido puesto de manifiesto en cerebelo de cerdo (Dawson 1971).

5.3.3.2 COMPARACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LA FRACCION MICROSOMAL DE CEREBRO Y DE CEREBELO DE RATA

La fracción microsomal de ambos tejidos se obtuvo tal como se describió en métodos (véase 4.3 y 4.4).

Los microsomas, lavados tres veces con el medio de homogeneización correspondiente (A o B), se tratan con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A o en B. Las actividades enzimáticas se determinaron en el sobrenadante de ultracentrifugación después del tratamiento con el detergente. Tales actividades se expresan, como es habitual, en partes por 10.000, referidas en cada caso a la fracción soluble del tejido correspondiente (Tabla XXXIII). Cuando se determinaron las actividades LDH, MDH, ADA, GAH y PNP, el medio en el que se obtuvieron los microsomas y se determinaron las actividades fue el medio A. Para el ensayo con la 5'N se trabajó en todo momento con el medio B.

Los resultados (Tabla XXXIV) muestran una variación entre ambos tipos de microsomas. No obstante, salvo en el caso de la GAH, cuyo valor está muy disminuido al igual que ocurría en la fracción soluble, las diferencias no son tan significativas co-

TABLA XXXIV

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS DE LA FRACCION MICROSO-
MAL DE CEREBRO Y DE CEREBELO DE RATA POR TRATAMIENTO CON
DESOXICOLATO 0,075 %

Enzima	Cerebro	Cerebelo
LDH	100	73
MDH	100	62
ADA	100	110
GAH	100	42
PNP	100	93
5'N	100	133

Las fracciones microsomales de cerebro y cerebelo de rata (véase 4.3 y 4.4) se lavaron tres veces con el medio de homogeneización y, a continuación, se trataron con desoxicolato 0,075 % (p/v) en el medio de lavado. Las actividades enzimáticas se determinaron en el sobrenadante del tratamiento con desoxicolato. Cuando se determinó la actividad 5'N, todo el proceso se efectuó con el medio B, incluyendo la homogeneización del tejido; en los demás casos se usó el medio A. Los resultados son comparativos y se da el valor 100 a la actividad de cada enzima (pp 10.000) liberada de la fracción microsomal de cerebro de rata. Las actividades (pp 10.000) vienen referidas en cada caso a las que exhibe cada enzima en la fracción soluble del tejido correspondiente (véase tabla XXXIII).

mo para permitir formular alguna hipótesis en relación a que la fracción microsomal aislada de cerebro sea comparativamente distinta de la aislada de cerebelo.

5.3.4

DISCUSION

El conjunto de los resultados presentados en este capítulo puede permitir establecer diferencias en la localización de la LDH, la MDH, la ADA, la GAH, la PNP y la 5'N, en dos regiones diferentes del encéfalo (cerebro y cerebelo), así como dentro del tejido cerebral. Los experimentos reseñados, efectuados con microsomas, con vesículas sinápticas y con jugos obtenidos por "expresión", sugieren la distinta localización subcelular de los enzimas mencionados.

Al comparar las actividades enzimáticas exhibidas por la fracción soluble de cerebro y de cerebelo de rata, no se observan diferencias de actividad acusadas excepto con la actividad de la GAH que, en cerebelo, es mucho menor que la que aparece en la fracción soluble de cerebro. Aunque la diferencia comentada no sea suficiente como para atribuirle la significación de característica diferencial, estructural y funcional, entre ambas regiones del SNC, si puede constituir un indicio de que el substrato de la GAH, la guanina, desempeñe algún papel significativo en dicha diferencia. En lugar de atribuir exclusivamente a la guanina la característica diferencial, podría sugerirse que fuesen los niveles de guanina y de xantina (producto de la transformación de la guanina por la GAH) los responsables, en parte, de tal efecto. La escasa, o nula actividad de GAH en cerebelo ha sido puesta de manifiesto anteriormente para el enzima de otras especies (Dawson 1971, Carpenne et al 1976) y se ha descrito su distribución regional en cerebro de rata, así como su ausencia en cerebelo de rata (Mansoor et al 1963). Se ha demostrado, también, que las metilxantinas modulan la liberación de purinas en el SNC y no se descarta la posible existencia en el SNC de receptores específicos para estos compuestos purínicos (Stone

et al 1981).

Los experimentos de obtención de jugos por "expresión" del tejido cerebral, muestran que aparece en ellos la ADA en mayor proporción que el resto de los enzimas, en comparación con las actividades presentes en la fracción soluble de cerebro. El hecho puede constituir una prueba en apoyo de la hipótesis de que la ADA sea un ectoenzima, lo que le permitiría liberarse con más facilidad por ultracentrifugación prolongada del tejido que otros enzimas localizados en el interior de la célula. Este extremo, que ha sido confirmado para la 5'N procedente de cultivos de células cerebrales, no había podido ser confirmado para la ADA (Trams y Lauter 1975). Los resultados aquí descritos, obtenidos con los microsomas de cerebro sugieren, también, el carácter de ectoenzima de la ADA. Las actividades 5'N y ADA ligadas a los microsomas se encuentran localizadas hacia el exterior de las vesículas microsomales y se ponen plenamente de manifiesto antes de desorganizar las membranas microsomales por tratamiento con desoxicolato (véase 5.3.2.2).

El que la ADA y la 5'N tengan la misma localización subcelular en los microsomas de cerebro no implica, necesariamente, que ambos sean ectoenzimas, como en el caso de la 5'N (loc. cit.); sin embargo, constituye una fuerte presunción en favor de la hipótesis de que, al menos una parte de la ADA, esté localizada en esta región de la célula. Así, en las células cerebrales cultivadas, se ha demostrado que existe una ADA particulada cuya localización es idéntica a la de la 5'N que, además, es un enzima marcador de la membrana plasmática (loc. cit., Evans y Gurd 1973, Depierre y Karnovsky 1974 b, Brake et al 1978). En tejidos de rata se ha demostrado que la 5'N se encuentra en la superficie celular, pero también en el interior de la célula, en la cara extracitoplasmática de las ve-

sículas del interior celular; además de estos resultados, que confirman los aquí obtenidos, se ha indicado que existe una relación dinámica entre la 5'N que presenta ambas localizaciones (Stanley et al 1980).

También se ha demostrado en cultivos de células cerebrales, que si se añade adenosina marcada al medio, ésta es transformada de forma rápida en inosina e hipoxantina; esta conversión requiere la captación de la adenosina por las células y la excreción de los productos de su catabolismo. El que la transformación tenga lugar preferentemente de esta manera, no es óbice para que Trams y Lauter (1975) no descarten la posibilidad de que la ADA sea un ectoenzima. Es posible, también, que aunque la ADA esté localizada en la superficie celular pueda actuar, alternativamente, como un transportador de membrana captando adenosina hacia el interior de la célula.

La actividad 5'N ligada a los microsomas no se pone de manifiesto si la fracción se obtiene en medios que contienen EDTA. Sin embargo, al eliminar el EDTA la actividad 5'N se va recuperando. Así, la pérdida de actividad 5'N no es debida a que el EDTA secuestre algún metal necesario para la actividad del enzima y se podría sugerir que el efecto fuera debido a una alteración por el EDTA de la carga superficial de la membrana que provocara una inhibición del enzima; este fenómeno sucede con otros enzimas de las membranas plasmáticas, de las membranas mitocondriales y del retículo endoplasmático (Wojtczak 1979). No obstante, como el efecto desaparece cuando se solubiliza el enzima (loc. cit.) es más probable que el EDTA actúe de forma que modifique la conformación del enzima, ya que la inhibición ejercida también se produce con el enzima de la fracción soluble (véase 5.3.2.1) y con el enzima puri-

ficado de cerebro bovino (Mallol et al 1982 a y b); en estas condiciones, la inhibición es irreversible y , además, se ha demostrado la ausencia de iones metálicos constitutivos de la molécula enzimática (Mallol et al 1982 b).

Hay que destacar que, en experimentos realizados con el enzima unido a la membrana de los bastones de la retina, se demuestra que la 5'N se libera de las membranas en la obscuridad, y las características cinéticas del enzima unido y del enzima solubilizado, son idénticas (Fukui y Shichi 1981). Es pues probable que el efecto del EDTA sobre el enzima unido sea idéntico al que ejerce sobre el enzima que se obtiene en la fracción soluble o en los purificados parciales. Incluso es posible que el enzima obtenido de la fracción soluble se haya liberado de las membranas durante el proceso de homogeneización y de centrifugación diferencial.

En el presente trabajo se ha demostrado, por medio de electroforesis, que la ADA de la fracción soluble y la solubilizada de los microsomas es la misma, lo cual parece apoyar la hipótesis anterior.

Stanley et al (1980) han confirmado que el aumento de actividad 5'N que se produce en hepatocitos de rata, al homogeneizar el tejido o cuando éste se trata con detergentes, es debido a la liberación del enzima localizado en el interior de la célula. Ambos enzimas, el localizado en la superficie celular y el liberado del interior celular, son indistinguibles tanto por su inhibición por anticuerpos específicos como por su comportamiento cinético con AMP. En células de plasmocitoma, la 5'N unida a la membrana y la solubilizada de ella, tienen un comportamiento cinético análogo (Lelievre y Zachowsky 1977). También existe una 5'N localizada en el interior de las células musculares humanas y asociada a las membranas del

sarcolema (Champaneria y Pennington 1981).

El comportamiento de la 5'N unida a los microsomas cuando éstos se trataron con concentraciones crecientes de desoxicolato, es similar al de la glucosa-6-fosfatasa cuando se realizó un experimento análogo con microsomas de hígado de rata (Weihing et al 1972). En los mismos experimentos se demostró que la unión de la NADPH-citocromo c reductasa a los microsomas de hígado de rata es más lábil que la de la glucosa-6-fosfatasa (loc.cit.). En las membranas celulares de diversos tejidos de rata, la 5'N se solubiliza con concentraciones elevadas de tritón X-100 (2 %) o de desoxicolato (1 %) (Riemer y Widnell 1975). Así pues, la 5'N se puede considerar como una proteína constituyente de las membranas microsomales de cerebro de rata.

En estudios realizados en tejido cerebral de ratón (Suran 1973) se ha demostrado que la 5'N se encuentra en el axoplasma asociada con la mielina, mientras que la mayor actividad específica de la 5'N en cerebro de cobaya se obtiene en la mielina (Pechan 1970). En conjunto, es posible que la actividad 5'N de la fracción microsomal de cerebro de rata corresponda a varios orgánulos subcelulares, como la mielina, la membrana plasmática e incluso las membranas del retículo endoplasmático; todas ellas forman parte de dicha fracción microsomal, como se ha demostrado por medio de su caracterización ultraestructural (véase el capítulo siguiente: 5.4.2.4.1 y 5.4.2.4.2).

También son las actividades 5'N y ADA las que se extraen de las vesículas sinápticas en mayor proporción que el resto de los enzimas, al comparar con las actividades que se obtienen de los microsomas. La ADA cuya actividad relativa es del 30% en comparación con la extraída de los microsomas (Tabla

XXXI) muestra un comportamiento muy distinto al de la LDH, MDH, GAH y PNP, con actividades relativas entre 2 y 3 %. La actividad relativa de la 5'N es intermedia, cercana al 12 %. Estos resultados confirman la presencia de la 5'N, y sobre todo de la ADA, en las vesículas sinápticas y además en una proporción que sugiere que el papel de estas enzimas es importante, así como el de determinados compuestos purínicos, en la transmisión nerviosa que se lleva a cabo en las sinapsis. Burnstock (1972 a y b), al formular la hipótesis del nervio purinérgico se basó, entre otros hechos, en la existencia de ATPasa, de 5'N y de ADA en el tejido nervioso. Así pues, la localización concreta de la 5'N y de la ADA en las vesículas sinápticas puede apoyar la mencionada hipótesis de Burnstock (loc.cit.). La existencia del resto de los enzimas estudiados, en la fracción de vesículas sinápticas se pudo deber a su presencia en tales vesículas, o a que se liberaran de otro tipo de vesículas que contaminan la fracción (Figuras 15 y 16) (Soller et al 1973). La existencia de enzimas citosolubles, como la LDH, se ha demostrado, también, en las vesículas sinápticas de cerebro de rata obtenidas por el método de Whittaker et al (1964) (Morgan et al 1973). El que la ADA y la 5'N se liberaran de las vesículas contaminantes es una hipótesis poco probable ya que, si fuese así, cabría esperar que ambas enzimas se liberaran en proporciones similares al resto de los enzimas, como ocurre en los microsomas. Wombacher (1978) ha demostrado la existencia de un complejo multienzimático en la fracción citoplasmática de corteza adrenal de buey; en él intervienen la 5'N, la fosfodiesterasa y la ADA que intervendrían en el catabolismo del $3',5'\text{-AMP}_c$. Se podría sugerir la existencia de un complejo multienzimático compuesto por la ATPasa, la 5'N y la ADA, que metabolizara el ATP en las terminaciones nerviosas purinérgicas.

La distribución regional de la actividad 5'N, especialmente, la que exhibe el cerebelo y el hipocampo, condujo a Scott (1967) a sugerir que el enzima puede actuar en procesos bioquímicos simples, y en funciones neurofisiológicas. En el presente estudio, la observación del distinto comportamiento que exhiben la 5'N y la ADA respecto a los restantes enzimas, especialmente su elevada actividad en las vesículas sinápticas, son hechos que concuerdan con la hipótesis de Scott y constituirían una prueba en favor de la hipótesis de la existencia de terminaciones nerviosas purinérgicas en el SNC (Burnstock 1975 b).

5.4 CARACTERIZACION DE LOS MICROSOMAS DE
CEREBRO DE RATA

5.4.1 VARIACION DE LA CANTIDAD DE MICROSOMAS
SEPARADOS SEGUN EL METODO DE AISLAMIENTO
EMPLEADO

La obtención de la fracción microsomal, a partir del sobrenadante post-mitocondrial, puede variar con el método de separación; uno de los factores cuya influencia puede ser más acusada es la naturaleza del medio en que se efectúa la separación. La influencia de otros factores puede ser también notoria. Se ha tratado de determinar aquí como pueden influir diversas circunstancias en la composición y en la cantidad de la fracción microsomal que se separa.

5.4.1.1 INFLUENCIA DE LA RELACION DE HOMOGENEIZACION
(ml/g tejido) EN LA SEPARACION DE MICROSOMAS
DE CEREBRO DE RATA

Se ha tratado de determinar si la relación de homogeneización se refleja significativamente en la cantidad de los microsomas que se obtienen.

Se tomaron, con este objeto, dos porciones de 12 g de cerebro de rata y se homogeneizaron con el medio A. La primera porción se homogeneizó con 72 ml de A (relación de homogeneización: 6 ml de A /g cerebro) y la segunda con 108 ml de A (relación: 9 ml/g cerebro).

La fracción microsomal se separó de ambos homogeneizados por el método habitual (véase 4.3). Los residuos de centrifugación se lavaron tres veces con el medio A y, una vez lava-

dos, ambos residuos se trataron con 15 ml de disolución de desoxicolato 0,075 % (p/v) en el medio A. En los sobrenadantes se determinaron las actividades LDH, MDH, ADA, GAH y PNP. En la tabla XXXV se muestran de forma comparativa los resultados obtenidos. En las fracciones solubles respectivas, después de ser sometidas a filtración a través de gel de Sephadex G-25 (véase 4.17.1), se determinaron las mismas actividades enzimáticas (Tabla XXXVI).

En la fracción soluble, las actividades de los enzimas estudiados son análogas, tanto si la relación de homogeneización es de 6 ml/g, como si es de 9 ml/g. Cuando la relación de homogeneización fue de 9 ml/g, un 50 % más elevada que la de 6 ml/g, la obtención de microsomas fue superior en más de un 30%. La absorbancia comparativa (a 260 o a 280 nm) de la suspensión de microsomas obtenidos en ambos casos fue de 137 :: 100; es decir, un 37 % superior cuando la relación de homogeneización fue de 9 ml/g. La proteína total liberada en el tratamiento con desoxicolato fue también superior (32 %) cuando la relación de homogeneización fue más elevada; en este caso, también las actividades enzimáticas fueron superiores, entre un 35 y un 39 % para los enzimas del catabolismo purínico, y entre un 47 y un 54 % para las deshidrogenasas (véase tabla XXXV).

Los resultados muestran una variación cuantitativa de la obtención de microsomas al variar la relación (p/v) de homogeneización del tejido, y que el rendimiento es mayor al aumentar dicha relación de homogeneización.

TABLA XXXV

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS AISLADOS AL VARIAR LA RELACION DE HOMOGENEIZACION (ml/g tejido)

Enzima	(µcat totales en el lavado)	
	relación 6 ml/g	relación 9 ml/g
LDH	100	147
MDH	100	154
ADA	100	136
GAH	100	135
PNP	100	139
A_{280} de los MC (a)	100	137
Proteína (b)		
(mg totales en sobrenadante del tratamiento con desoxicolato)	4,66(100)	6,16(132)

La fracción microsomal de cerebro se obtuvo por homogeneización del tejido en el medio A por el método habitual (véase 4.3). Se usaron dos relaciones de homogeneización: 6 y 9 ml de A por g de tejido. Las fracciones microsomales separadas se lavaron tres veces con A, después se trataron con desoxicolato 0,075% (p/v) en A. Las actividades se determinaron en el sobrenadante del tratamiento con desoxicolato. Los resultados son comparativos y se asigna el valor 100 a las actividades correspondientes a los MC separados mediante la relación 6ml/g.

(a) Suspensión de microsomas en el tercer lavado con A

(b) Datos expresados en mg totales. Entre paréntesis se dan los datos comparativos (se asigna el 100 a la proteína que corresponde a los MC separados mediante la relación 6ml/g).

TABLA XXXVI

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA OBTENIDA AL VARIAR LA RELACION DE HOMOGENEIZACION (ml / g tejido)

Enzima	(µcat / g tejido)	
	Relación 6 ml/g	Relación 9 ml/g
LDH	1,17	1,14
MDH	2,3	2,1
ADA	0,0021	0,0021
GAH	0,013	0,013
PNP	0,006	0,006

La fracción soluble de cerebro se obtuvo por homogeneización del tejido en el medio A por el método habitual (véase 4.3). Se usaron dos relaciones de homogeneización: 6 ml y 9 ml de A por g de tejido. La determinación de actividades se efectuó en las respectivas fracciones solubles obtenidas previa filtración en gel de Sephadex G-25 equilibrado con A. Los resultados se expresan en µcat/g de tejido.

5.4.1.2 INFLUENCIA DE LA CONSTANTE DIELECTRICA DEL MEDIO DE HOMOGENEIZACION EN LA SEPARACION DE LOS MICROSOMAS

Con objeto de establecer si la cantidad de microsomas que se obtiene puede variar con el medio de extracción usado, se procedió a obtener homogeneizados de tejido cerebral median-

te el empleo de medios diferentes, cuya constante dieléctrica (Akerloff 1932) es distinta de la del agua (constante dieléctrica = 78 - Cte. dieléctrica del vacío = 1 -).

Se escogieron los cuatro medios de homogeneización que se indican :

A : medio A (sacarosa 0,28 M, tris 25 mM, EDTA 1mM, HCl pH 7,4)

- Cte. dieléctrica = 78
- Densidad = 1,0355 g/ml
- Viscosidad = 1,03 cpoises

C : etilenglicol 40 % (v/v)

- Cte. dieléctrica = 68
- Densidad = 1,0518
- Viscosidad = 1,15 cpoises

D : dimetilsulfóxido de x = 0,196

- Cte. dieléctrica = 74
- Densidad = 1,0740 g/ml
- Viscosidad = 1,10 cpoises

E : urea 1,5 M

- Cte. dieléctrica = 82
- Densidad = 1,0320
- Viscosidad = 1,04 cpoise

Los medios C, D y E contuvieron tris (25 mM), EDTA 1mM y se ajustó el pH a 7,4 con HCl.

Se confeccionaron homogeneizados en los cuatro medios citados, siendo la proporción de 6,5 ml/g, que es la empleada habitualmente. La separación de la fracción microsomal se

llevó a cabo tal como se ha descrito (véase 4.3). Las cuatro fracciones microsomales así obtenidas se lavaron tres veces con el medio A y se trataron con desoxicolato 0,075% en A en la forma habitual. Las actividades enzimáticas se determinaron en las fracciones solubles que se obtuvieron, en cada caso, y que se filtraron a través de gel de Sephadex G-25 equilibrado con el medio A (véase 4.17.1) (Tabla XXXVII) y en los sobrenadantes separados tras el tratamiento del residuo de microsomas con desoxicolato (Tabla XXXVIII).

Los resultados muestran que las cantidades de enzima extraídas, o puestas de manifiesto, dependen del medio de homogeneización empleado. Las diferencias observadas en las cantidades ($\mu\text{cat/g}$ tejido) de cada uno de los enzimas que aparecen en la fracción soluble obtenida con cada medio, podrían ser debidas a efectos variables que sobre cada enzima ejerzan cada uno de los medios usados; podrían provocar éstos la activación, o la inhibición de los enzimas considerados, pero cabe considerar, también, la diferente capacidad de extracción de los enzimas durante la homogeneización del tejido cerebral de rata. Esta última sugerencia puede apoyarse, en primer lugar, en que las cantidades de enzima extraídas con cada uno de los cuatro medios son muy diferentes y, en segundo lugar, en que la mayor actividad de un enzima en la fracción soluble obtenida en un medio determinado no es paralela, necesariamente, con la del resto de los enzimas extraídos ni con la de proteína (Tabla XXXVIII).

La cantidad de fracción microsomal que se separa con cada uno de los cuatro medios es muy distinta. La cantidad de microsomas mayor y paralelamente de las actividades enzimáticas ligadas a ellos, se obtuvo con el medio D de dimetilsulfóxido (cte. dieléctrica 74), seguida de las obtenidas con el medio C de etilenglicol (cte. dieléctrica 68), con el medio A (cte.

TABLA XXXVII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA FRACCION SOLUBLE OBTENIDA POR HOMOGENEIZACION DE CEREBROS DE RATA EN MEDIOS DE DISTINTA CONSTANTE DIELECTRICA

Enzima	Medio A	Medio C	Medio D	Medio E
LDH	100	151	87	100
MDH	100	102	150	108
ADA	100	151	132	136
GAH	100	138	99	131
PNP	100	149	116	138
Proteína (mg/g tejido)	16,87(100)	23,09 (137)	13,82(82)	23,99(142)
% ácidos nucleicos	2,6	2,2	2,4	2,0

Los cerebros de rata se homogeneizaron en cuatro medios distintos: el medio A habitual, el medio C (etilenglicol 40%), el medio D (DMSO x= 0,196) y el medio E (urea 1,5 M). La relación de homogeneización fue de 6,5 ml/g y las respectivas fracciones se obtuvieron según el método habitual (véase 4.3). La determinación de las actividades enzimáticas se llevó a cabo después de filtrar las disoluciones en gel de Sephadex G-25 equilibrado con A. Los resultados son comparativos y se asigna el valor 100 a las actividades exhibidas por la fracción soluble aislada en el medio A. El porcentaje de ácidos nucleicos se determinó según el método de Warburg y Christian (1941).

(a) Los valores de proteína se expresan en mg/g tejido. Entre paréntesis se muestran los datos comparativos, asignando el valor 100 a la que se obtuvo en la fracción soluble aislada en el medio A.

TABLA XXXVIII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS DE LA FRACCION MICROSOMAL DE CEREBRO DE RATA SEPARADA POR HOMOGENEIZACION DEL TEJIDO EN MEDIOS DE DISTINTA CONSTANTE DIELECTRICA

Enzima	Medio A	Medio C	Medio D	Medio E
LDH	100	179	385	55
MDH	100	213	371	59
ADA	100	141	260	75
GAH	100	222	481	69
PNP	100	152	294	58
Proteína	100 (0,148 mg/ml)	184	320	93
% ácidos nucleicos	5,0	3,0	2,1	6,3
Peso húmedo de MC (g/g tejido)	0,0576	0,0949	0,1330	0,0587
A relativa de los MC a 280 nm (a)	100	172	295	83

Los cerebros de rata se homogeneizaron en cuatro medios distintos A, B, C y D (véase tabla XXXVII). La relación de homogeneización fue de 6,5 ml/g y las respectivas fracciones se obtuvieron según el método habitual (véase 4.3). Los microsomas separados se lavaron tres veces con el medio A y se trataron, a continuación, con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. Las actividades enzimáticas se determinaron en el sobrenadante después del tratamiento con desoxicolato. Los resultados son comparativos y se asignan los valores de 100 para los MC aislados en A. El porcentaje de ácidos nucleicos se determinó según el método de Warburg y Christian (1941).

(a) La suspensión de MC en la que se determinó la absorbancia a 280 nm fue la del tercer lavado con el medio A.

dieléctrica 78) y con el medio B de urea (cte. dieléctrica 82). Las diferencias observadas no pueden ser debidas, exclusivamente, a la variación de la constante dieléctrica del medio, ya que el orden es distinto; los rendimientos de separación no son paralelos con el de los valores de aquéllas. Tampoco se puede explicar la diferencia en los resultados, exclusivamente, por la distinta densidad o viscosidad de los medios en que se ha efectuado la homogeneización. Puede sugerirse que al aumentar la densidad del medio, el sobrenadante post-mitocondrial es más rico en MC (por ser menos abundante la precipitación que se efectuó a 12.500 x g, 30 min en la forma habitual -véase 4.3-); no obstante, la diferencia de densidad en los cuatro medios es mínima (entre 1,0320 del medio E y 1,0740 del medio D). Así pues, el mayor rendimiento cuantitativo que se obtuvo con el medio D con dimetilsulfóxido (DMSO) puede ser consecuencia de las acciones concertadas que se han comentado anteriormente y de un efecto específico, del DMSO, distinto al de los demás medios y que se discutirá posteriormente. La proporción de ácidos nucleicos que aparece en el sobrenadante tras el tratamiento con desoxicolato, fue menor (2 %) cuando se obtuvieron los microsomas en el medio D (con DMSO), la proporción, varía con el medio de homogeneización empleado y aumenta (D, C, A y E) en el mismo orden en que disminuye la cantidad de microsomas separados (Tabla XXXVIII).

5.4.1.3 OBTENCION DE MICROSOMAS EN MEDIOS DE DIFERENTE CONTENIDO EN DIMETILSULFOXIDO

La separación de la fracción microsomal en medios que contienen DMSO proporcionan rendimientos más elevados. Se ha tratado de comprobar aquí si la presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) induce alteraciones permanentes en los componentes de la fracción particulada. Para ello se llevaron a cabo los experimentos que a continuación se describen.

5.4.1.3.1 Efecto de la variación de la concentración de DMSO en la separación de microsomas

Se partió de cinco fracciones de tejido cerebral de 5 g cada una. Cada fracción se homogeneizó con los medios que se describen a continuación:

D 1 : Tris (50 mM) - EDTA (1 mM) - HCl de pH 7,4

D 2 : 100 ml de D1 + 25 ml de DMSO, pH 7,4

D 3 : 100 ml de D1 + 50 ml de DMSO, pH 7,4

D 4 : 100 ml de D1 + 75 ml de DMSO, pH 7,4

D 5 : 100 ml de D1 + 100 ml de DMSO, pH 7,4

La homogeneización y la posterior obtención de los microsomas se efectuó a 0 - 4 °C por el método habitual (véase 4.3).

Las cinco fracciones microsomales se lavaron tres veces con el medio A y se suspendieron, después, con 20 ml de desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. En los sobrenadantes obtenidos tras los tratamientos respectivos con el detergente, y en las cinco fracciones solubles obtenidas (previa filtración en gel de Sephadex G-25 equilibrado con A), se determinaron las activi-

dades de los enzimas LDH y GAH. Se midió la absorción a 260 y a 280 nm de las cinco suspensiones de microsomas en el tercer lavado con el medio A, y en la suspensión posterior de los microsomas en desoxicolato 0,075 % (p/v) en A.

En las cinco distintas fracciones solubles obtenidas, se pone de manifiesto que la actividad LDH fue disminuyendo al aumentar la concentración de DMSO; la actividad GAH también disminuyó al aumentar la concentración de DMSO pero en menor medida que la LDH (Tabla XXXIX).

Los valores de la figura 17 demuestran que la cantidad de microsomas obtenidos aumentó con la concentración de DMSO. Las actividades LDH y GAH liberadas de los microsomas, la absorbancia a 280 nm de tales microsomas y su peso húmedo, aumentan al elevar la concentración de DMSO. Al representar tales valores frente a la concentración de DMSO, se observa, en todos los casos, que la dependencia no es lineal con respecto a la concentración de DMSO (Figura 17), sino que el aumento de las actividades liberadas así como la cantidad de microsomas obtenidos es "quasi" exponencial.

La dependencia que se observa entre la concentración de DMSO y el rendimiento en la obtención de la fracción microsomal ponen de relieve la existencia de interacciones entre el DMSO y las partículas, cuya naturaleza es, por el momento, desconocida; igualmente, se desconoce si las interacciones entre el DMSO y las membranas es reversible.

TABLA XXXIX

ACTIVIDADES LDH Y GAH DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA OBTENIDA POR HOMOGENEIZACION DEL TEJIDO EN MEDIOS DE DISTINTA CONCENTRACION DE DMSO

Enzima	$\mu\text{cat/g}$ tejido				
	Medio D1	Medio D2	Medio D3	Medio D4	Medio D5
LDH	1,73	1,86	1,78	1,48	1,06
GAH	0,017	0,016	0,016	0,016	0,014

Los cerebros de rata se homogeneizaron en cinco medios distintos. En el medio D1 el DMSO estaba ausente; en los demás medios, la cantidad de DMSO fue aumentando hasta que en el medio D5 fue de 50% (v/v) en el medio D1 (véase 5.4.1.3.1). Las respectivas fracciones solubles se obtuvieron según el método habitual (véase 4.3). Las actividades enzimáticas se determinaron después de filtrar en gel de Sephadex G-25 equilibrado con el medio D1. Los resultados se expresan en $\mu\text{cat/g}$ tejido.

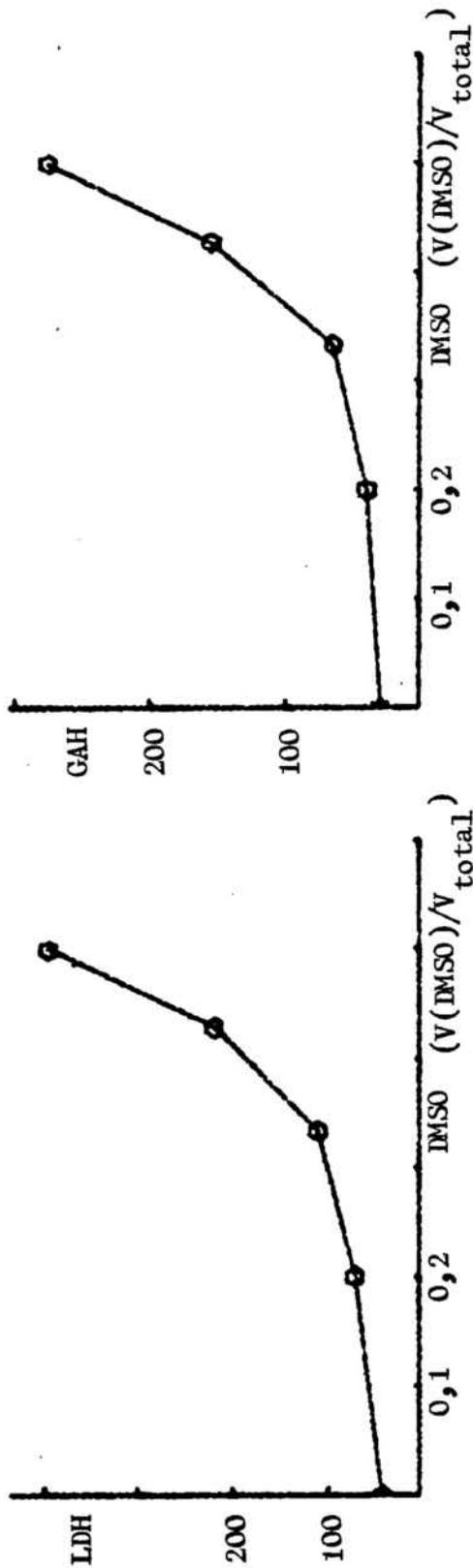
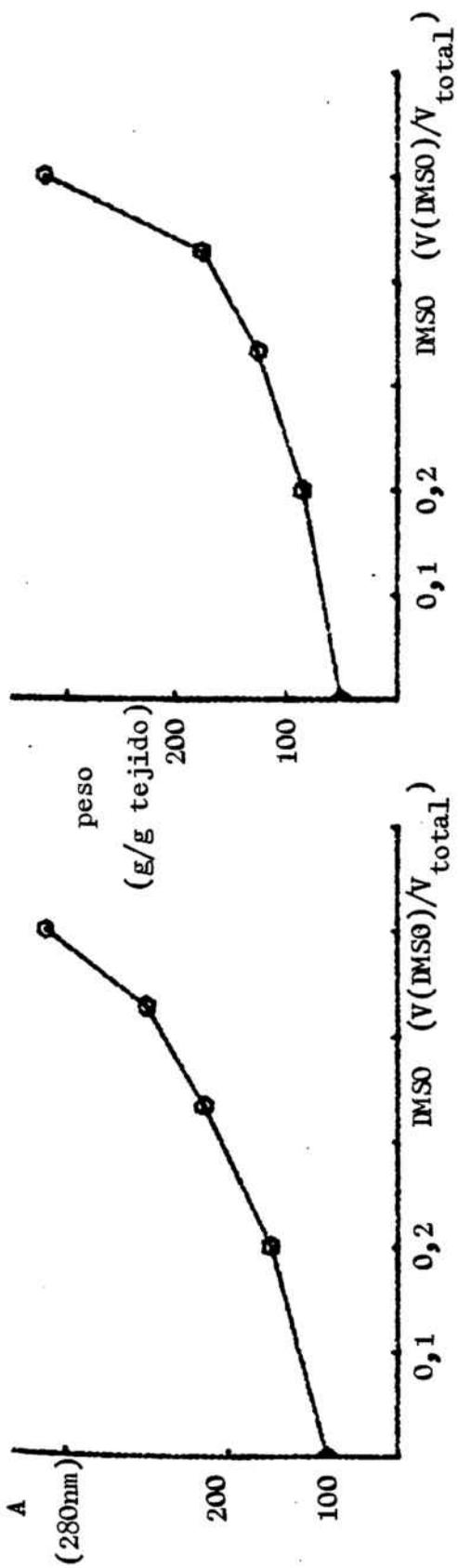


FIGURA 17.- CANTIDAD DE MICROSOMAS Y ACTIVIDADES LDH Y GAH LIGADAS A ELLOS EN EXPERIMENTOS EN LOS QUE VARIO LA CONCENTRACION DE DMSO.- Los cerebros de las ratas se homogeneizaron con medios preparados por mezcla de DMSO con el medio D1 constituido por Tris(50 mM)-EDTA(1mM)-HCL de pH 7,4 . Los microsomas aislados (véase 4.3) se lavaron tres veces con A. La absorbancia a 280 nm se determinó en las suspensiones en el tercer lavado con A. Los respectivos "microsomas lavados" se pesaron y se trataron con desoxicolato 0,075 %. Las actividades LDH y GAH se determinaron en los sobrenadantes tras el tratamiento con desoxicolato. En ordenadas se expresan unidades arbitrarias.

5.4.1.3.2

Reversibilidad de la acción del DMSO en la
separación de microsomas

A fin de establecer si las interacciones del DMSO sobre la fracción de microsomas son reversibles, se han efectuado diversos experimentos.

Se partió de tres muestras de 6, 6 y 12 g de tejido cerebral. La primera se homogeneizó con 36 ml del medio A habitual; la segunda se homogeneizó con 36 ml del medio A habitual y la tercera se homogeneizó con 72 ml del medio D5 descrito anteriormente (véase 5.4.1.3.1). Al primer homogeneizado se le añadieron 36 ml de D5 y se obtuvo el homogeneizado denominado A + D. Al segundo homogeneizado se le añadieron 36 ml de DMSO y se obtuvo en conjunto, un medio similar al D5; se le asignó la denominación de medio A + DMSO. Del tercer homogeneizado se hicieron dos alícuotas; a la primera se le añadieron 36 ml de A y se obtuvo la porción denominada D + A; a la segunda se añadieron 36 ml de D5 y se obtuvo la porción denominada D + D. La adición de los homogeneizados se efectuó a 0 - 4 °C gota a gota y con agitación continua. El esquema de las operaciones descritas aparece en la figura 18.

A partir de las cuatro suspensiones, se obtuvieron las cuatro fracciones microsomales correspondientes por el método habitual (véase 4.3). Las distintas fracciones microsomales se lavaron tres veces en el medio A y finalmente se trataron con 20 ml de desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. Se determinaron las actividades de los enzimas, LDH, MDH, ADA, GAH y PNP en las cuatro fracciones solubles (previa filtración en gel de Sephadex G - 25 equilibrado con A) y en los cuatro sobrenadantes obtenidos tras el tratamiento con el detergente. Los resultados obtenidos se compararon con los que se obtuvieron en los experimentos habituales de aislamiento de microsomas ya

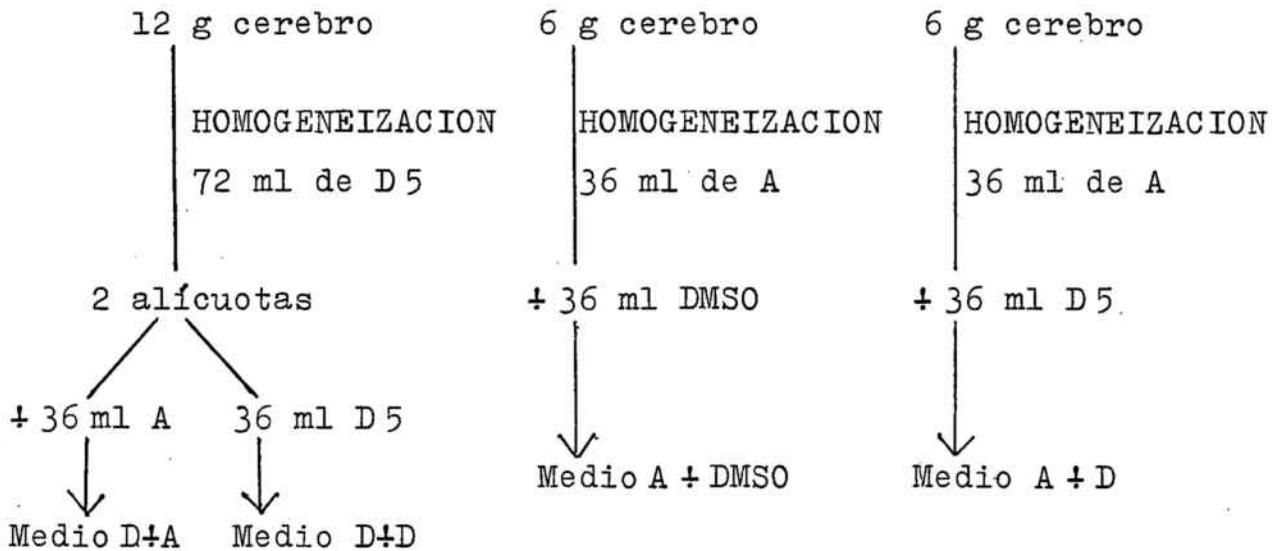


FIGURA 18. — ESQUEMA DE OBTENCION DE HOMOGENEIZADOS EN EL EXPERIMENTO EFECTUADO PARA DEMOSTRAR LA REVERSIBILIDAD DEL EFECTO CAUSADO POR EL DMSO EN LA OBTENCION DE MICROSOMAS (Véase 5.4.1.3.2)

descritos (véase 5.2.5 y tablas XIII - XVI) y se muestran en las tablas XL y XLI.

Los resultados indican que la acción ejercida por el DMSO es parcialmente reversible. Así, cuando al homogeneizado preparado con v ml de A se le añaden v ml del medio D5 o v ml de DMSO, aumenta la cantidad de microsomas que se separan y paralelamente la cantidad de actividades enzimáticas (por g de tejido) liberadas de ellos, si se comparan con los valores obtenidos habitualmente tras una homogeneización con A. No obstante, en ninguno de los dos casos comentados, se separa la cantidad de microsomas, ni se libera la actividad de los enzimas asociada a los mismos, que tiene lugar al homogeneizar el tejido cerebral con el medio D5. Recíprocamente, cuando al homogeneizado efectuado con v ml del medio D5 se le añaden v ml de A, la cantidad de microsomas separados y las actividades enzimáticas asociadas son menores que cuando el

TABLA XL

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA OBTENIDA AL VARIAR LA CONCENTRACION DE DMSO DEL MEDIO DESPUES DE HOMOGENEIZAR EL TEJIDO EN MEDIOS CON O SIN DMSO

Enzima	µcat/g tejido				
	A	A + D	A + DMSO	D + A	D + D
LDH	1,2	1,7	1,0	1,6	1,0
MDH	2,2	2,3	1,7	2,5	2,1
ADA	0,0016	0,0015	0,0014	0,0018	0,0014
GAH	0,014	0,017	0,013	0,016	0,012
PNP	0,006	0,007	0,006	0,007	0,006

El esquema de obtención de los distintos homogeneizados, antes de ser sometidos a centrifugación diferencial, se muestra en la figura 18. La fracción soluble se obtuvo a partir de cada homogeneizado, según el método habitual (véase 4.3). La determinación de actividades enzimáticas se efectuó después de filtrar en gel de Sephadex G-25 equilibrado con el medio A. Los resultados se expresan en µcat/g cerebro.

TABLA XLI

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS DE LOS MICROSOMAS SEPARADOS AL VARIAR LA CONCENTRACION DE DMSO DEL MEDIO
DESPUES DE HOMOGENEIZAR EL TEJIDO EN MEDIOS CON O SIN DMSO

Enzima	A pp 10.000	A + D pp 10.000	A + DMSO pp 10.000	D + A pp 10.000	D + D pp 10.000
LDH	86	145	437	317	861
MDH	61	162	464	253	748
ADA	70	103	233	196	490
GAH	71	94	243	178	467
PNP	83	105	285	237	549
A relativa a 280 nm (a)	100	177	659	369	1104

El esquema de obtención de los distintos homogeneizados se muestra en la figura 18. A partir de cada homogeneizado, la fracción microsomal se obtuvo según el método habitual (véase 4.3). Los MC se lavaron tres veces sucesivas con A y se trataron con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. La determinación de las actividades enzimáticas se llevó a cabo en el sobrenadante después del tratamiento con desoxicolato. Los resultados se expresan en pp 10.000 de actividad liberada de los microsomas correspondientes a 1 g de tejido respecto a la actividad de cada enzima en la fracción soluble (véase pie tabla XIII)

(a) La suspensión de MC en la que se efectuó la determinación de la absorbancia a 280 nm fue la del tercer lavado en A. Resultados comparativos: Valor 100 a la absorbancia de los MC aislados en el medio A.

homogeneizado se prepara en el medio D5 . A pesar de la disminución observada, las cantidades obtenidas (microsomas y actividades enzimáticas asociadas) son superiores, comparativamente, a las que se obtienen cuando se usa el medio A. Por tanto, con el medio A se obtienen, comparativamente, menor cantidad de microsomas que con el medio D5 , con el que la cantidad es muy superior. Después de homogeneizar con A (o con D5) , si varía la composición del medio, para que sea más parecido a D5 (o a A) no se obtuvieron nunca una cantidad de microsomas, tan elevada (o tan pequeña), como las que se obtuvieron con D5 (o con A).

Así pues, parece que el DMSO, además de ejercer su acción cuando se añade a un homogeneizado ya obtenido, la ejerce también, de forma más efectiva, durante el proceso de homogeneización.

En la tabla XL se demuestra que las actividades enzimáticas que aparecen en la fracción soluble no varían, substancialmente, al variar el medio de homogeneización utilizado. Si bien hay una ligera disminución de la actividad de todos los enzimas al aumentar la cantidad de DMSO usada, la LDH es la que muestra una disminución más acusada. La LDH y la MDH se liberan, comparativamente, en mayor cantidad que el resto de los enzimas de los microsomas separados en presencia de concentraciones crecientes de DMSO. Este fenómeno no es fácilmente explicable aunque hay que destacar el hecho de que las formas enzimáticas de LDH y de MDH, que se liberan de los microsomas separados de medios que contienen DMSO, son las mismas y en proporción análoga a las que se liberan de los microsomas separados en el medio A habitual (Véase 5.4.2.3.2).

TABLA XLII

ACTIVIDADES DE LOS ENZIMAS MARCADORES DE ORGANULOS SUBCELULARES EN LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA AISLADA CON O SIN DMSO

Enzima	$\mu\text{cat/g}$ cerebro	
	MEDIO A	MEDIO D 5
GDH	$0,0054 \pm 0,0007$	$0,008 \pm 0,002$
Catalasa	$0,99 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,01$
NADPH-cit c reductasa	$0,0003 \pm 0,0001$	$0,0003 \pm 0,0001$
Fosfatasa ácida	$0,009 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$
Glucosa - 6 - fosfatasa (a)	$0,057 \pm 0,005$	$0,028 \pm 0,004$
Tiamín pirofosfatasa (a)	-	-
5'N (b)	$0,0007 \pm 0,0001$	$0,0008 \pm 0,0002$
Proteína		
mg/g	18,8	14,3

Los cerebros se homogeneizaron alternativamente en el medio A, exento de DMSO, y en el medio D5, con DMSO 50% (v/v) (véase 5.4.1.3.1). Las respectivas fracciones solubles se obtuvieron según el método habitual (véase 4.3). La determinación de las actividades enzimáticas se efectuó después de filtrar las disoluciones en gel Sephadex G-25 equilibrado con A. Los resultados se expresan en $\mu\text{cat/g}$ tejido; son el promedio de dos experimentos análogos.

(a) Las actividades glucosa-6-fosfatasa y tiamín pirofosfatasa son poco significativas debido a la poca sensibilidad del método y a la baja actividad de estos enzimas en cerebro.

(b) Cuando se determinó la actividad 5'N, se repitió el experimento omitiendo el EDTA de los medios utilizados.

TABLA XLIII

ACTIVIDADES DE LOS ENZIMAS MARCADORES DE ORGANULOS SUBCELULARES LIBERADAS DE LA FRACCION MICROSOMAL AISLADA CON O SIN DMSO

Enzima	$\mu\text{cat/g}$ cerebro	
	MEDIO A	MEDIO D 5
GDH	$0,00023 \pm 0,00005$	$0,0007 \pm 0,0002$
Catalasa	0	0
NADPH-cit c reductasa	$0,00053 \pm 0,00005$	$0,0013 \pm 0,0001$
Fosfatasa ácida	$0,00058 \pm 0,00003$	$0,0023 \pm 0,0002$
Glucosa-6-fosfatasa (a)	$0,0063 \pm 0,0003$	$0,024 \pm 0,003$
Tiamín pirofosfatasa (a)	$0,00040 \pm 0,00005$	$0,0015 \pm 0,0004$
5'N (b)	$0,00038 \pm 0,00004$	$0,00109 \pm 0,00008$
LDH	$0,026 \pm 0,002$	$0,10 \pm 0,01$
MDH	$0,036 \pm 0,003$	$0,16 \pm 0,01$
Proteína		
mg/g cerebro	0,949	3,864

Los cerebros se homogeneizaron alternativamente en el medio A, exento de DMSO, y en el medio D5, con DMSO 50 % (v/v) (véase 5.4.1.3.1). Las respectivas fracciones microsomales se separaron según el método habitual (véase 4.3). Los microsomas se lavaron tres veces sucesivas con el medio A y, a continuación, con tritón X-100, 0,1 % en el medio A. Las actividades enzimáticas y el contenido en proteína se determinaron en los sobrenadantes después del tratamiento con el detergente. Los resultados se expresan en $\mu\text{cat/g}$; corresponden al promedio de dos experimentos análogos.

(a) Las actividades glucosa-6-fosfatasa y tiamín pirofosfatasa son poco significativas debido a la poca sensibilidad del método y a la baja actividad de estos enzimas en cerebro.

(b) Cuando se determinó la actividad 5'N se hizo en la suspensión de microsomas y omitiendo el EDTA de los medios utilizados.

tes del medio de homogeneización usado, ya que no variaron substancialmente de un medio al otro (Tabla XLIII).

La cantidad de microsomas aislados al homogeneizar el tejido en el medio D5 es mayor y se observa un incremento paralelo de las actividades de los enzimas marcadores liberados en comparación con los microsomas procedentes de la homogeneización del tejido en el medio A.

Aunque hay ligeras diferencias, al comparar las actividades liberadas de los microsomas que se obtienen en uno y otro medio de homogeneización, no se observa una variación significativa de unos enzimas con respecto a otros. Se puede concluir que, el aumento cuantitativo de la fracción microsomal obtenida al homogeneizar en tejido en el medio D5, en principio, no se debe a que aquella fracción contenga preferentemente algún tipo concreto de orgánulo subcelular.

5.4.2

PROPIEDADES FISICAS DE LOS MICROSOMAS

Con objeto de conseguir el subfraccionamiento de los microsomas obtenidos por homogeneización del tejido cerebral de rata en medios que contengan o no DMSO, se sometieron los microsomas a tres técnicas de separación distintas: la centrifugación isopícnica, el enfoque isoeléctrico y la filtración en gel. Las características estructurales de los microsomas se observaron con ayuda del microscopio electrónico (ME).

5.4.2.1 DENSIDAD DE FLOTACION. ULTRACENTRIFUGACION
ISOPICNICA EN PERCOLL

Para comprobar la homogeneidad o heterogeneidad de los microsomas de cerebro de rata encuancto a su densidad de flotación, se sometieron a experimentos de centrifugación isopícnica en "Percoll".

5.4.2.1.1 Ultracentrifugación isopícnica de residuos
microsomales obtenidos con y sin DMSO

Los experimentos previos demostraron que el tampón tris o el EDTA incorporados al medio A, provocan la aparición de una interfase en el tubo de centrífuga, análoga a la que aparece cuando los tubos de centrífuga no están bien equilibrados (H. Shayn -Pharmacia Fine Chemicals- Comunicación personal). Debido a ello, se prescindió sistemáticamente del tampón tris y del EDTA y se trabajó con sacarosa 0,28 M al efectuar las centrifugaciones isopínicas. También se estableció que la concentración de Percoll más adecuada en estos experimentos es del 10 %, preparada a partir de la disolución stock de Percoll suministrada por Pharmacia Fine Chemicals.

Se obtuvieron las fracciones microsomales correspondientes a 9 g de cerebro homogeneizados en ausencia de DMSO (100 ml del medio B) y a 4 g de cerebro homogeneizados en presencia de DMSO (40 ml de DMSO 50% (v/v) en el medio B, ajustado a pH 7,4). Los microsomas así obtenidos se sometieron a dos lavados sucesivos con 40 ml de sacarosa 0,28 M. Los residuos de ambos tipos de MC, una vez lavados, se suspendieron en 50 ml de sacarosa 0,28 M. Se tomaron 45,5 ml de la suspensión y se les añadió 4,5 ml de Percoll. Paralelamente se confeccionaron

dos blancos idénticos, por mezcla de 45,5 ml de sacarosa 0,28 M y 4,5 ml de Percoll. Las cuatro disoluciones se pusieron en tubos de ultracentrífuga correspondientes al rotor 35 FA y se centrifugaron a 25.000 r.p.m., 1 h.

Los resultados fueron análogos para los microsomas separados por los dos procedimientos; se obtuvo una única banda, ancha, que corresponde a tales orgánulos. La banda se extendió entre 0,9 y 1,2 cm del menisco, cuando los microsomas se obtuvieron en ausencia de DMSO, y entre 0,7 y 1,4 cm del menisco para los microsomas separados en presencia de DMSO.

La elución de todas las disoluciones sometidas a centrifugación se efectuó en 23 tubos de 2,2 ml en los que se determinaron las actividades LDH y 5'N y la absorción a 280 nm. En los controles se determinó el índice de refracción así como la absorción a 280 nm. Se determinó la absorción a 280 nm de los controles, ya que el Percoll absorbe a esta longitud de onda; a fin de restar la absorción debida al Percoll para determinar el perfil de absorción de los microsomas. Los resultados se muestran en las figuras 19 y 20. En ellas se pone de manifiesto la analogía entre las dos fracciones microsomales; también se demuestra que los microsomas se agrupan en una única, aunque amplia, zona del tubo. En experimentos realizados con concentraciones de Percoll del 30 %, los resultados fueron similares, aunque la zona en que se agrupan los microsomas es más reducida. La mayor actividad 5'N coincide con la banda de microsomas, mientras que aunque existe un pico de actividad LDH coincidente con la banda de microsomas, hay una elevada actividad LDH próxima al fondo de los tubos de centrifuga. Este fenómeno se debe, muy probablemente, a la existencia de fragmentos de membrana, de mayor densidad que el resto de microsomas, procedentes de ruptura de vesículas y a los cuales pueda hallarse unida la LDH. El hecho guardaría

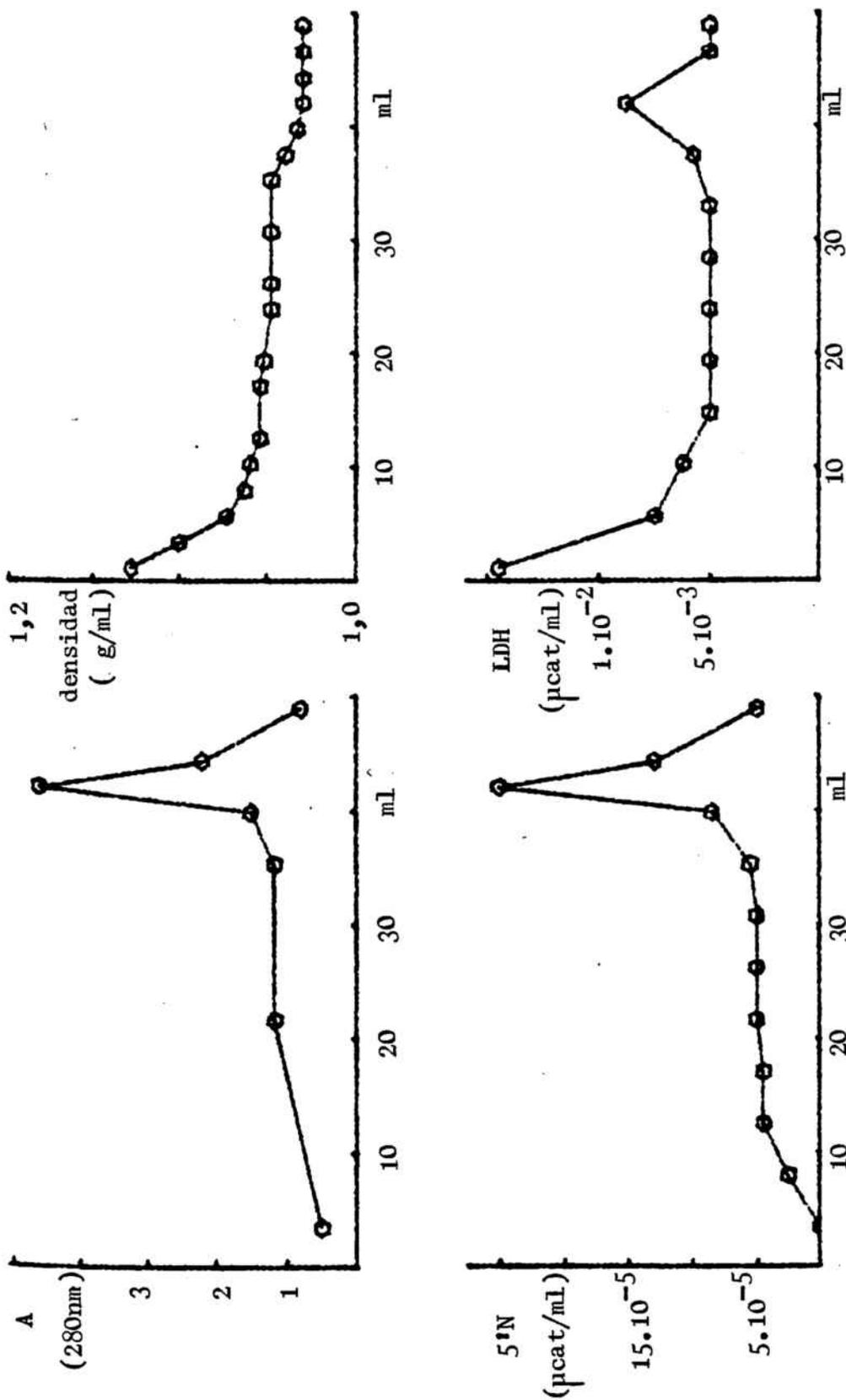


FIGURA 19.- ULTRACENTRIFUGACION ISOPICNICA EN PERCOLL (10%) DE SUSPENSIONES DE MICROSOMAS OBTENIDOS EN AUSENCIA DE IMSO. Los microsomas se obtuvieron en el medio B y en la forma habitual (véase 4.3). El residuo se lavó dos veces con sacarosa 0,28M. 45,5 ml de la suspensión se mezclaron con 4,5 ml de Percoll; el conjunto se centrifugó a 25.000 rpm 1h. La elución se efectuó desde el fondo del tubo (rotor 35 FA) y se recogieron fracciones de 2,2 ml en las que se determinó la absorbancia a 280 nm y las actividades LDH y 5'N. El índice de refracción y la absorción a 280 nm debida al Percoll se midieron en las fracciones recogidas de los tubos control en los que en lugar de la suspensión de MC se añadieron 45,5 ml de sacarosa 0,28M. Los resultados fueron similares para dos parejas de tubos de igual contenido.

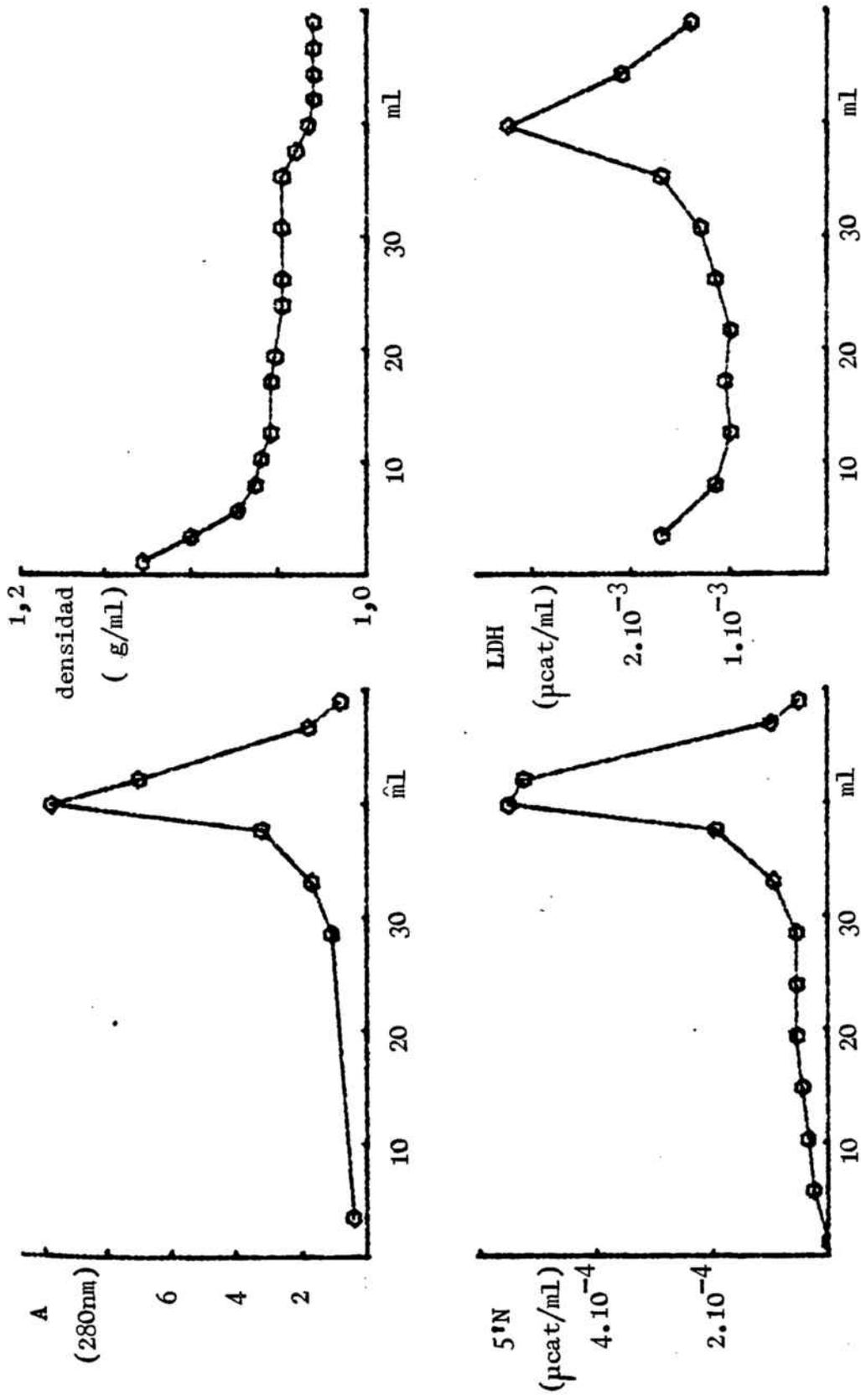


FIGURA 20.- ULTRACENTRIFUGACION ISOPICNICA EN PERCOLL (10%) DE SUSPENSIONES DE MICROSOMAS OBTENIDOS EN PRESENCIA DE DMSO. Los microsomas se aislaron en un medio de IMSO 50%(v/v) en B y en la forma habitual (véase 4.3). El residuo se lavó dos veces con sacarosa 0,28M y se resuspendió en el mismo medio; 45,5 ml de la suspensión se mezclaron con 4,5 ml de Percoll; el conjunto se ultracentrifugó a 25.000 rpm 1h. La elución se efectuó desde el fondo del tubo de centrifuga (Rotor 35FA) y se recogieron fracciones de 2,2 ml. El resto de operaciones fueron análogas a las especificadas en la figura 19, asimismo, para la suspensión de MC y para el control, se desarrolló el experimento en dos parejas de tubos confeccionados de forma análoga y en los que los resultados fueron prácticamente iguales.

semejanza con lo observado (Fernández-Santos 1978) al separar la fracción mitocondrial cruda en medio de sacarosa 0,25 M, cuyos orgánulos liberan LDH al ser tratados por medios de fuerza iónica creciente (hasta NaCl 0,15 M). Debe tenerse presente, además, que cuando las vesículas microsomales se tratan con desoxicolato, la liberación de LDH es muy considerable (véase 5.2.5).

5.4.2.1.2 Ultracentrifugación isopícnica de los microsomas presentes en los sobrenadantes post-mitocondriales

A fin de comprobar si el lavado de los microsomas provoca variaciones en su densidad de flotación, se efectuó un experimento similar al descrito anteriormente, pero con el sobrenadante post-mitocondrial. Ello se pudo efectuar debido a que se había logrado la separación en un medio en que la concentración de Percoll fue sólo del 10 %.

Se tomaron 24 g de cerebro de rata que se homogeneizaron con sacarosa 0,28 M y se centrifugó a 12.500 x g, 30 min. Se tomaron dos alícuotas de 45 ml del sobrenadante y se les añadieron 5 ml de Percoll a cada una, de modo que la proporción de reactivo fue del 10 %. Las dos disoluciones así preparadas y los dos blancos (45 ml de sacarosa 0,28 M y 5 ml de Percoll) se centrifugaron en tubos del rotor 35 FA a 25.000 r.p.m., 1h.

La elución se efectuó en 18 tubos de 2,8 ml cada uno y se determinó la actividad 5'N. No se determinó la actividad LDH de los eluidos ya que no pueden observarse diferencias significativas, dada la elevada actividad LDH en la fracción soluble que enmascara la actividad LDH ligada a los microsomas.

En los controles se determinaron el índice de refracción y la absorción a 280 nm, al igual que en el experimento anterior. La determinación de la actividad 5'N permitió identificar los microsomas tal como se observa en la figura 21; los resultados expuestos en ella son análogos a los que aparecen en las figuras 19 y 20. De todo ello se deduce que, si se consideran las densidades de flotación, los microsomas no sufren grandes alteraciones por los lavados sucesivos con sacarosa 0,28 M. Análogamente, puede suponerse que si los lavados se efectúan en el medio A, los microsomas tampoco experimentarán alteraciones apreciables; no obstante, no se ha podido demostrar la suposición, ya que el tris o el EDTA interfieren en la centrifugación isopícnica.

5.4.2.2 TAMAÑO DE PARTICULA. FILTRACION EN GEL DE EXCLUSION MOLECULAR (SEPHAROSE CL 4B)

Para determinar la homogeneidad de los microsomas en cuanto a su tamaño de partícula, se sometieron a filtración en gel de Sepharose CL 4B en una columna (2,6 x 64,8 cm) de 344 ml de volumen, aproximadamente. A esta columna, equilibrada con el medio correspondiente, se le aplicaron 7 ml de la suspensión de partículas en el medio de equilibrado.

Antes de proceder a la filtración de las suspensiones de partículas microsomales, se aplicaron a la columna, equilibrada con el medio B, 7 ml de dicho medio que contenían 2 mg/ml de fosfato de piridoxal, 2 mg/ml de azul de dextrano y 2 mg/ml de seroalbúmina bovina. El orden de elución fué el siguiente: el azul de dextrano en el ml 131, el fosfato de piridoxal en el ml 322 y la seroalbúmina bovina en una zona ancha que deno-

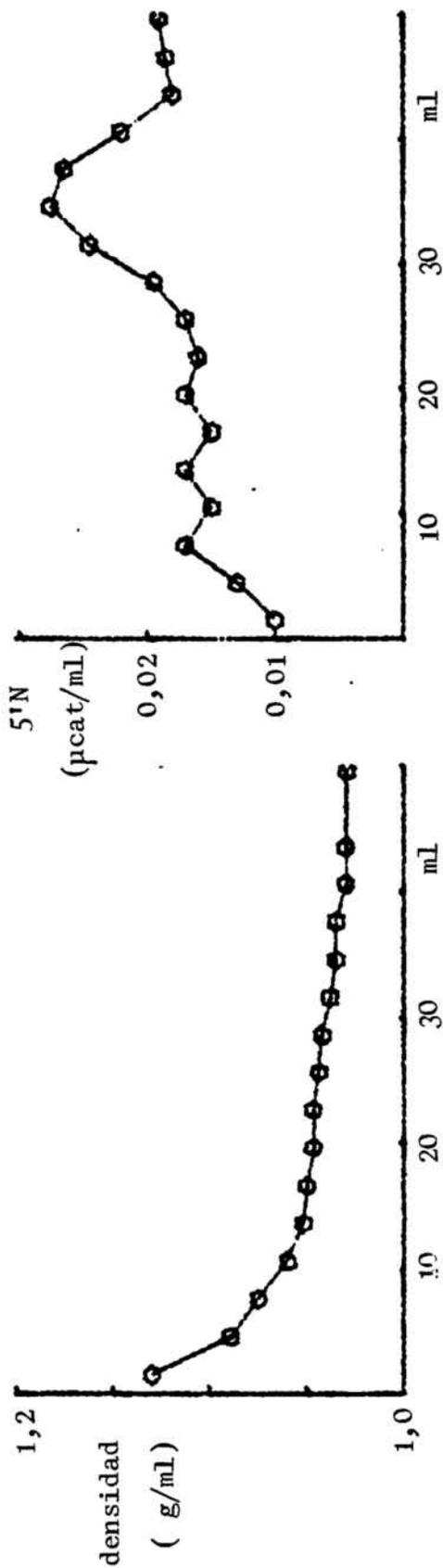


FIGURA 21.- ULTRACENTRIFUGACION ISOPICNICA EN PERCOLL DE SOBRENADANTES POST-MITOCONDRIALES OBTENIDOS EN AUSENCIA DE DMSO. Los sobrenadantes post-mitocondriales se obtuvieron por homogenización de los cerebros de rata en sacarosa 0,28 M y posterior centrifugación a 12.500 x g, 30 min. 45 ml del sobrenadante post-mitocondrial se mezclaron con 5 ml de Percoll; el conjunto se ultracentrifugó a 25.000 rpm, 1h. La elución se efectuó desde el fondo del tubo de ultracentrifuga (Rotor 35 FA) y se recogieron fracciones de 2,8 ml en las que se determinó la actividad 5'N. El índice de refracción se determinó en las fracciones recogidas de los tubos control en los que, en lugar del sobrenadante post-mitocondrial, se añadieron 45 ml de sacarosa 0,28M. Para el sobrenadante post-mitocondrial y para el control, se desarrolló el experimento en dos parejas de tubos confeccionados de forma análoga y en los que los resultados fueron prácticamente iguales.

tó interacciones específicas de la proteína con el gel. Posteriormente se aplicaron 7 ml del medio B conteniendo 2 mg/ml de azul de dextrano y 2 mg/ml de ferritina; la elución del azul de dextrano de produjo al recoger el ml 135 y la de la ferritina a los 245 ml.

Después de cada suspensión de microsomas aplicada a la columna, la elución se llevó a cabo con 400 ml del medio de equilibrado , seguidos de 400 ml del medio B que era a la vez, 1 M en NaCl. La elución con el medio de elevada fuerza iónica se efectuó para comprobar la posible retención de MC o de actividades enzimáticas en su paso a través de la columna.

5.4.2.2.1 Filtración de los residuos microsomales lavados, en eluyentes de baja fuerza iónica

En un primer experimento, se llevó a cabo la filtración del residuo de microsomas lavados dos veces con el medio B, con el que también se había equilibrado la columna. La suspensión de microsomas aplicada, diluida 1 : : 50 en el medio B, mostraba una absorción a 280 nm de 0,234 A, y contuvo 0,047 U/ml de 5'N.

El pico de microsomas eluyó en el volumen de 135 ml, o sea, cercano al de elución del azul de dextrano; de hecho, la elución de los microsomas comienza entre 2 y 3 ml antes del volumen de elución del azul de dextrano (figura 22 a).

En las fracciones de 4,3 ml recogidas, se determinaron las actividades LDH, MDH y 5'N y las absorciones a 280 nm (Figura 22).

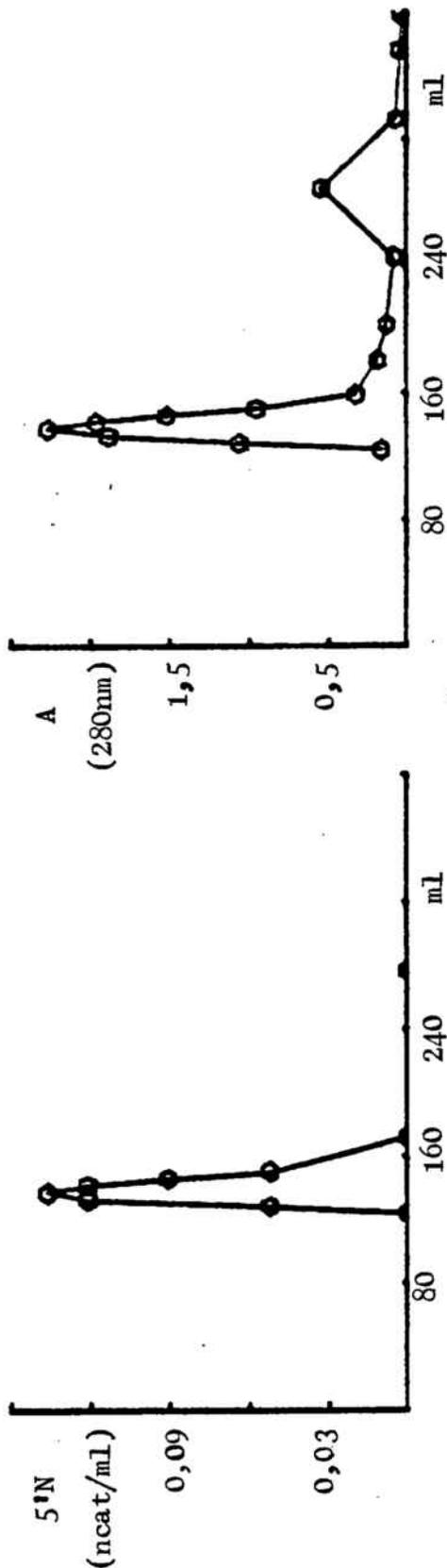
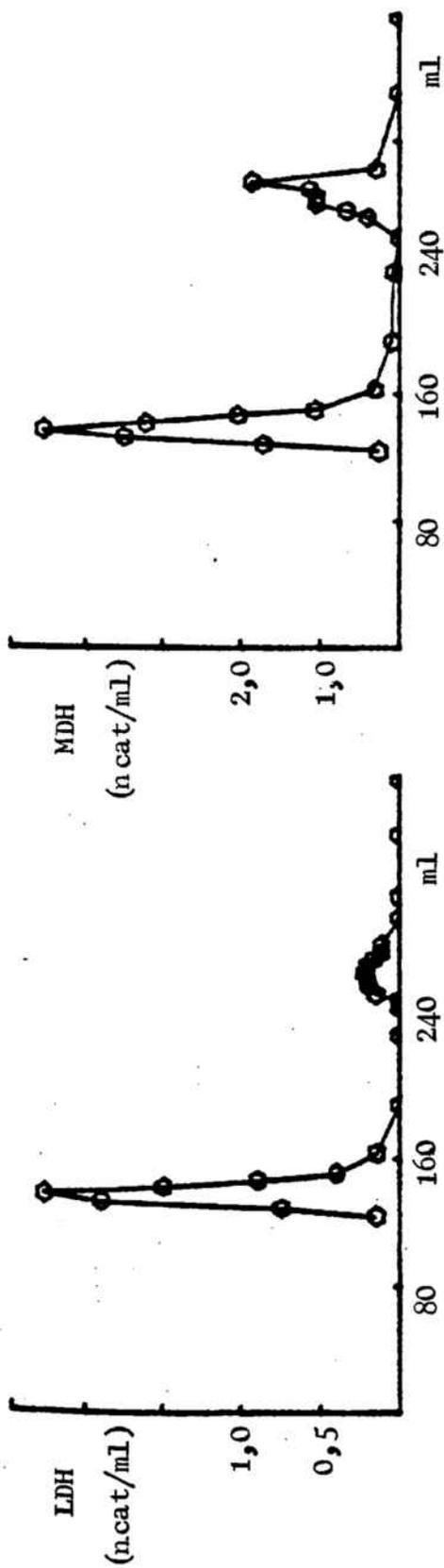


FIGURA 22.- FILTRACION DE RESIDUOS MICROSOMALES LAVADOS, EN GEL DE SEPHAROSE CL 4B EQUILIBRADO CON MEDIOS DE BAJA FUERZA IONICA.- Columna K-26 (Pharmacia). Volumen de lecho 344 ml. Columna equilibrada en el medio B. La aplicación consistió en MC separados en el medio B, lavados dos veces con B y suspendidos en B.

FIGURA 22 a.- ELUCION EN EL MEDIO B. La elución se efectuó con 400 ml del medio B. Fracciones de 4,3 ml. Actividades LDH, MDH y 5'N. Protefina : absorbancia a 280 nm.

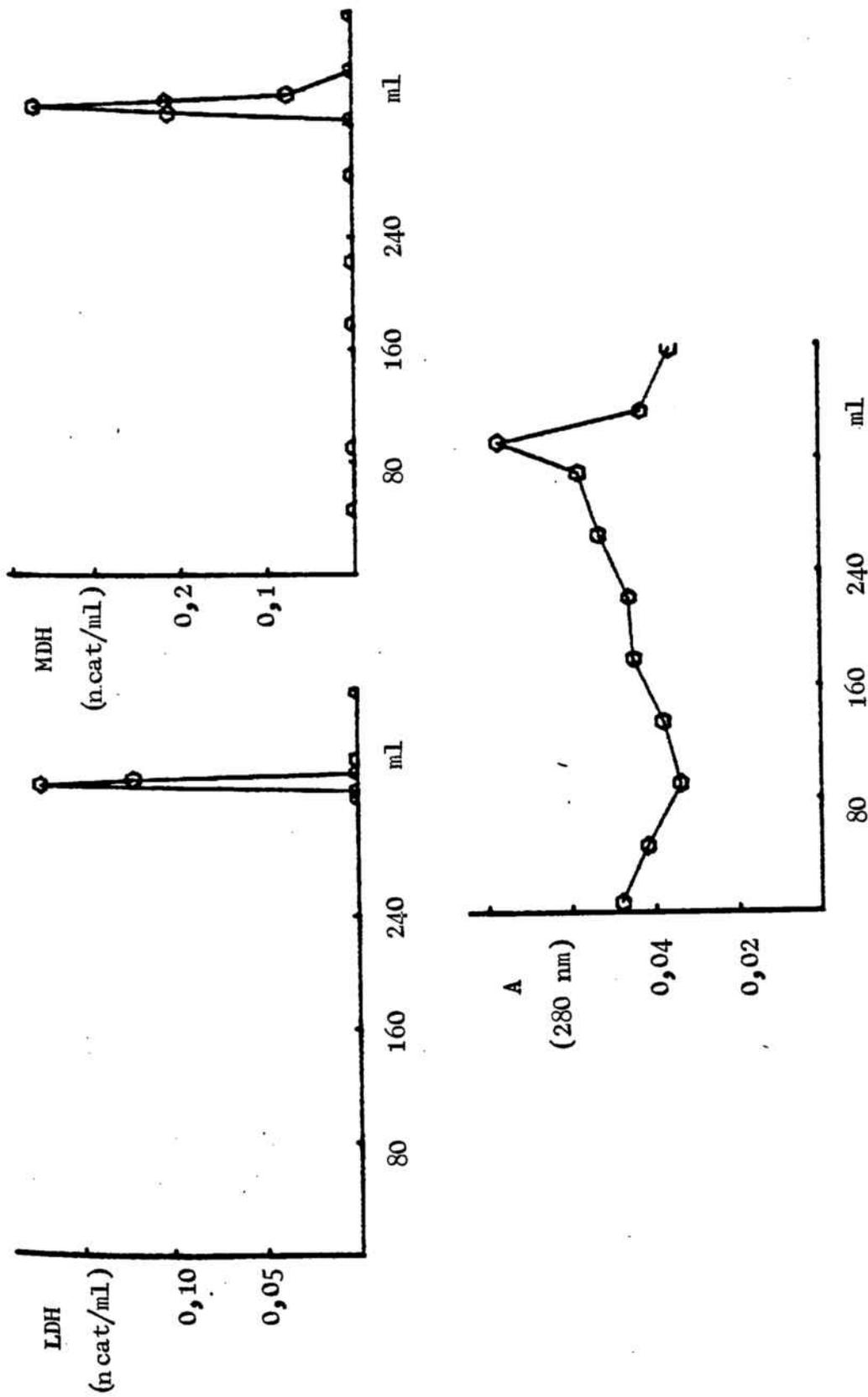


FIGURA 22 b.- ELUCION CON EL MEDIO B CONTENIENDO NaCl 1M. Después de la elución inicial con el medio B (Figura 22 a), se continuó con 400 ml del medio B conteniendo NaCl 1M. Fracciones de 4,3 ml. Actividades LDH y MDH. Protefna: absorbancia a 280 nm.

En los resultados que se muestran en la figura 22 a se revela que los microsomas eluyen en un pico que coincide con los picos de actividad LDH, MDH y 5'N. Si la filtración se efectúa con la columna equilibrada en el medio A y los microsomas suspendidos en el medio A, los resultados son similares a los de la figura 22, aunque debido a la presencia de EDTA no se puede determinar la actividad 5'N. En estas condiciones, el volumen de elución de los microsomas es de 135 ml.

Los resultados de la figura 22 a demuestran, también, que la unión de los enzimas LDH y MDH a las membranas microsomales, no es una consecuencia del método de separación, ya que las actividades enzimáticas LDH y MDH no ligadas a los microsomas se eluyen a volúmenes comprendidos entre 250 y 300 ml, mientras que en el volumen de elución de los microsomas (entre 125 y 150 ml) eluyen las actividades LDH y MDH ligadas a ellos. La 5'N no muestra un comportamiento paralelo al de LDH y MDH; la diferencia observada se basa en que la actividad 5'N que se libera al tratar los microsomas con medios que no contienen tensoactivos es muy reducida. Por esta razón, no fue posible determinar la pequeña actividad 5'N que existe, probablemente, en el volumen de elución y que corresponde al enzima solubilizado de las membranas microsomales.

En la figura 22 b, se muestran las actividades LDH y MDH que se ponen de manifiesto por elución con el medio B conteniendo NaCl 1M. Los resultados parecen indicar que ambos enzimas interaccionan con el soporte y quedan retenidos en la columna cuando se efectúa la elución con el medio B. Otra posibilidad es que los enzimas mencionados se hallen en los microsomas que interaccionan con el soporte y permanecen retenidos en el interior de la columna. En este último supuesto, el NaCl 1M liberaría las actividades LDH y MDH, pero los microsomas quedarían retenidos.

Después de efectuar la elución con el medio B, que contiene NaCl 1M, al practicar una elución posterior con cloruro de guanidinio 4 M no se libera ninguna cantidad apreciable de proteína por lo que no tiene lugar la liberación de los MC retenidos.

5.4.2.2.2 Filtración de los residuos microsomales lavados, en eluyentes de fuerza iónica moderada (NaCl 0,15 M)

Para comprobar si el volumen de elución de los microsomas era consecuencia de un retraso, debido a posibles interacciones electrostáticas con el soporte, se experimentó con el gel equilibrado en el medio B que contiene NaCl 0,15 M.

Los microsomas, lavados dos veces con el medio B, se suspendieron en el medio B conteniendo NaCl 0,15 M, para su aplicación a la columna. La absorción a 280 nm de la aplicación de microsomas, diluída 1::25 en el medio B, fue de 0,311 A , y contenía 0,034 U/ml de 5'N.

El pico de microsomas eluyó en el volumen de 136 ml, análogo al volumen de elución de los microsomas aplicados a la columna equilibrada en el medio B.

Las actividades enzimáticas LDH, MDH y 5'N se determinaron en las fracciones de 4,3 ml recogidas, así como también las absorciones a 280 nm.

Los resultados obtenidos (figura 23) son análogos a los de la figura 22 y muestran picos de actividad LDH, MDH y 5'N coincidentes con el pico de microsomas (Figura 23 a). También se pone de manifiesto que las interacciones de los enzimas LDH y MDH con los microsomas no son iónicas ya que, si fuese

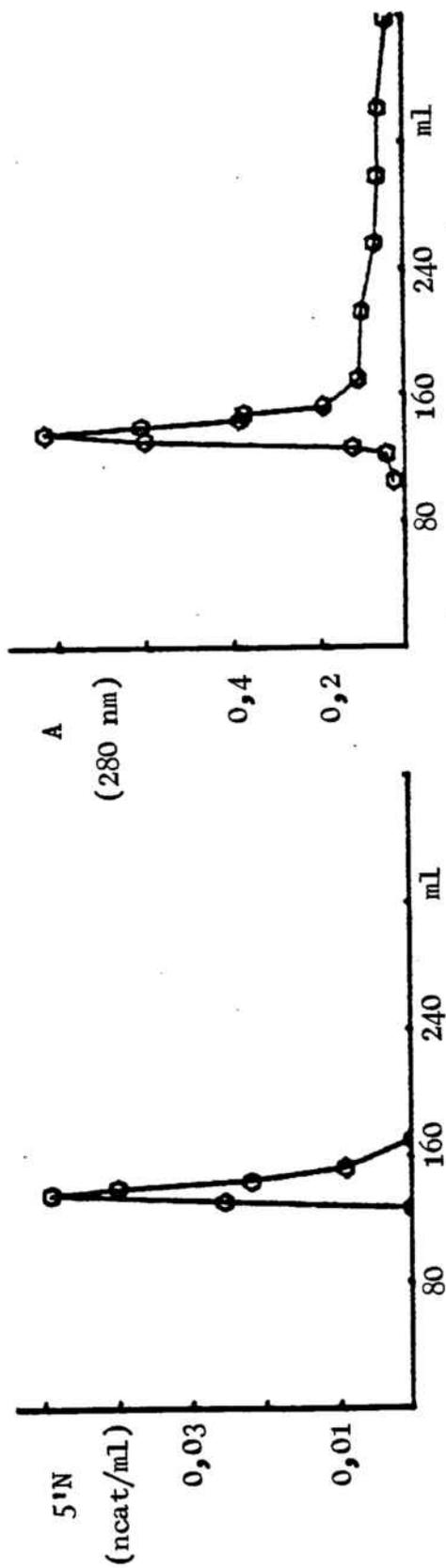
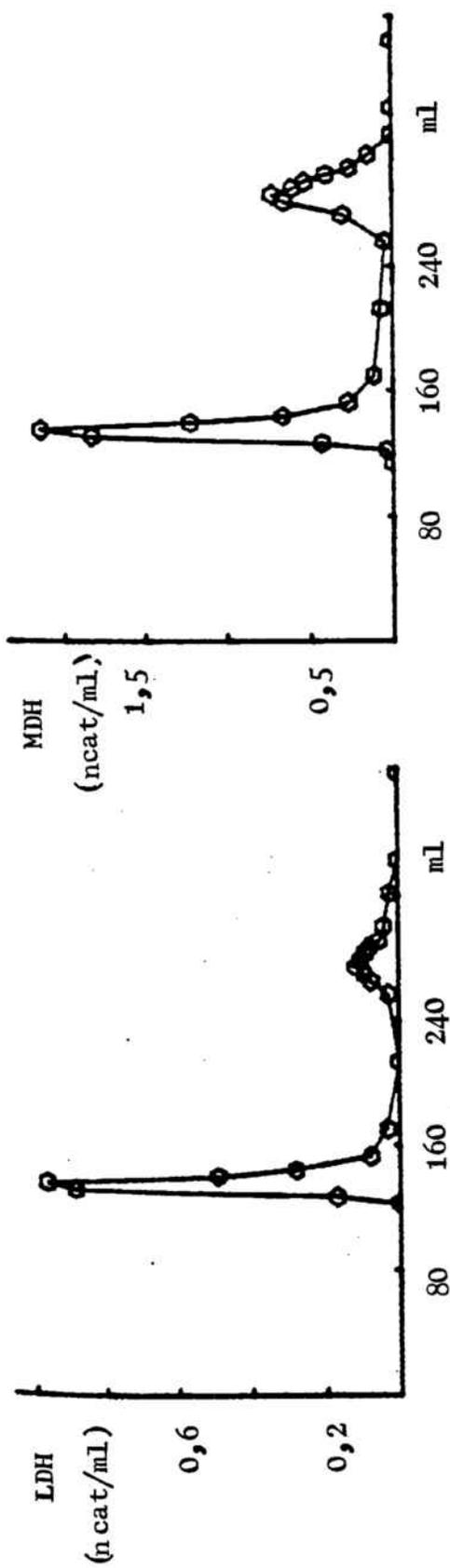


FIGURA 23.- FILTRACION DE RESIDUOS MICROSOMALES LAVADOS, EN GEL DE SEPHAROSE CL 4B EQUILIBRADO CON NaCl 0,15M. Columna K-26 (Pharmacia). Volumen de lecho 344 ml. Columna equilibrada en el medio B conteniendo NaCl 0,15 M. La aplicación consistió en MC separados en el medio B, lavados dos veces con B y suspendidos en B conteniendo NaCl 0,15 M.

FIGURA 23 a.- ELUCION EN EL MEDIO B CONTENIENDO NaCl 0,15M. La elución se efectuó con 400 ml del medio B conteniendo NaCl 0,15M. Fracciones: 4,3 ml. Actividades LDH, MDH y 5'N. Protefina: absorbancia a 280 nm.

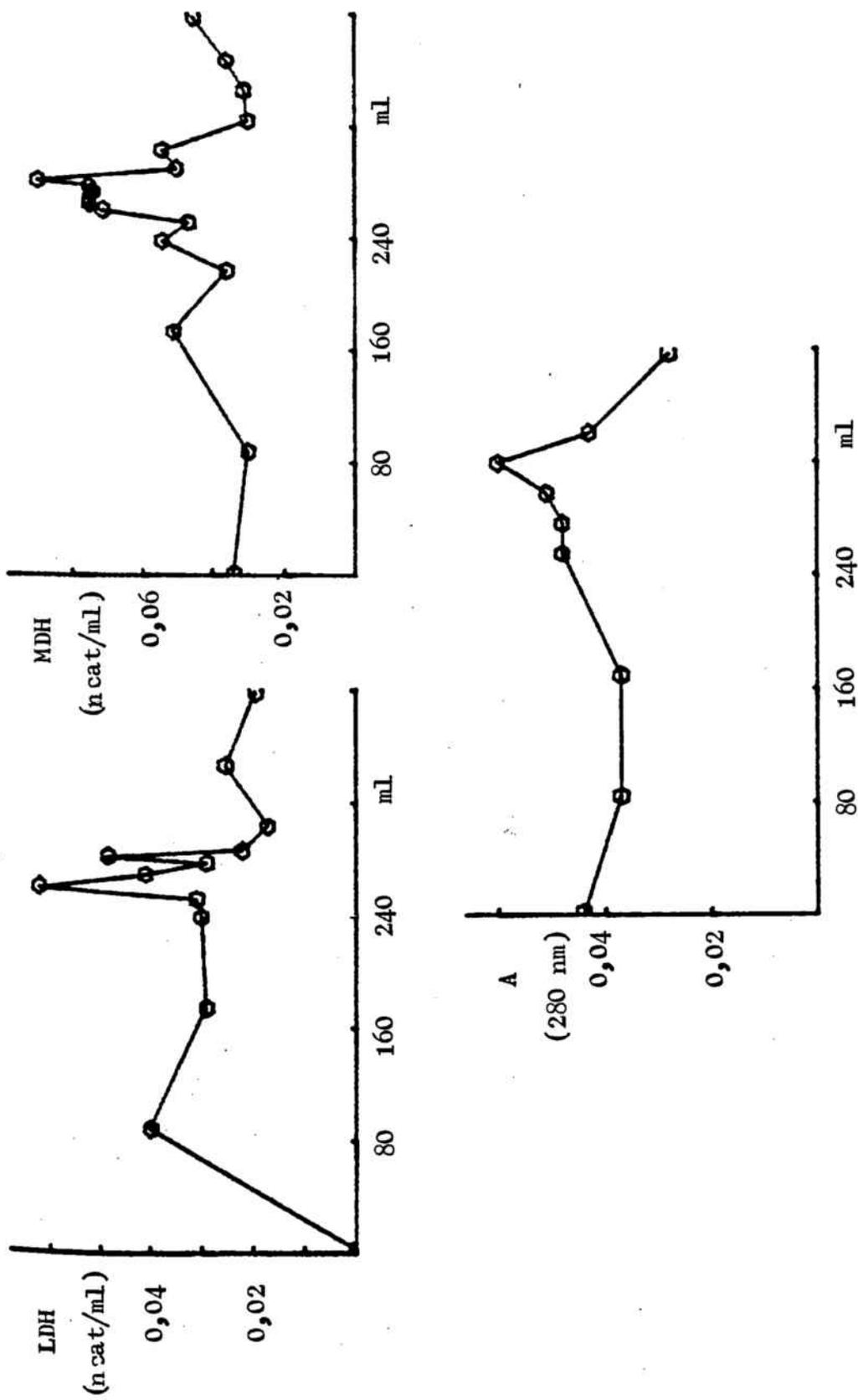


FIGURA 23 b.- ELUCION CON EL MEDIO B CONTENIENDO NaCl 1M. Después de la elución inicial con el medio B conteniendo NaCl 0,15 M, continuó con 400 ml del medio B conteniendo NaCl 1M. Fracciones de 4,3 ml. Actividades LDH y MDH. Protefna: absorbancia a 280 nm.

así, se liberarían por completo al pasar las partículas por la columna equilibrada con el medio B conteniendo NaCl 0,15 M y toda la actividad LDH y MDH aparecería en el volumen de elución correspondiente a los enzimas libres, mientras que no se detectarían las actividades mencionadas en el pico de los microsomas (Figura 23 a). A fin de confirmar esta suposición se determinaron los valores de actividad LDH y MDH de la suspensión de microsomas aplicada a la columna, así como los de las fracciones eluidas entre el ml 125 y el ml 154, reunidas (Tabla XLIV).

Parte de las actividades LDH y MDH de la aplicación de microsomas a la columna se han liberado de las membranas microsomales (Tabla XLIV) y deben ser las que se eluyen a volúmenes altos (Figura 23 a). Por otra parte, en los eluidos reunidos, parte de las actividades LDH y MDH que se detectan se han liberado de las membranas, aunque esta liberación es posterior a su elución ya que si no fuese así, hubieran eluido a volúmenes más elevados. La liberación observada, puede ser debida a un efecto de descomposición de los microsomas eluidos o a que, al estar los microsomas más diluidos (de 7 ml de aplicación, se recogen 29 ml en los eluidos) la liberación es más favorable. La liberación de la actividad LDH y MDH no es completa ya que los microsomas eluidos y separados por centrifugación, siguen mostrando ambas actividades.

Las actividades LDH y MDH que se ponen de manifiesto por elución en el medio B conteniendo NaCl 1 M (Figura 23 b) parecen confirmar las mismas hipótesis formuladas en el apartado anterior (véase 5.4.2.2.1).

TABLA XLIV

ACTIVIDADES LDH Y MDH EN LA APLICACION DE MICROSOMAS Y EN
LOS ELUIDOS DE UNA COLUMNA DE SEPHAROSE CL 4B

	LDH(ncat/ml)	MDH(ncat/ml)
Aplicación de MC	1,61 (100)	5,57 (100)
Sobrenadante de la aplicación de MC	0,63 (39)	3,40 (61)
Reunión de eluidos	0,68 (100)	1,32 (100)
Sobrenadante de la reunión de eluidos	0,44 (65)	1,03 (78)

Las actividades enzimáticas LDH y MDH se determinaron en la suspensión de MC que se aplicó a la columna de Sepharose CL 4B (2,6 x 64,8 cm) y en los eluidos reunidos. En ambas disoluciones se determinaron las actividades, tanto en la suspensión como en el sobrenadante que quedó después de separar los microsomas por ultracentrifugación (105.000 x g, 90 min, rotor 35 FA, 4°C). Los valores se expresan en ncat/ml y entre paréntesis se expresan los resultados comparativos, asignando el valor 100 a las actividades de las suspensiones.

5.4.2.2.3 Filtración de residuos microsomales lavados en medios de fuerza iónica elevada (NaCl 1M), en eluyentes de baja fuerza iónica

Con objeto de establecer el efecto que sobre los microsomas ejercen los lavados con medios de fuerza iónica elevada, se sometió a aquellos a dos lavados con el medio B* conteniendo

NaCl 1M antes de su aplicación a la columna equilibrada con el medio B.

Los microsomas lavados dos veces, como se ha indicado, se suspendieron en el medio B. La absorción a 280 nm de la suspensión de microsomas, diluida 1::25 en el medio B, fue de 0,342 y contuvo 0,035 U/ml de 5'N.

Las actividades enzimáticas LDH, MDH y 5'N se determinaron en las fracciones de 4,3 ml recogidas, así como también las absorciones a 280 nm.

Coincidiendo con el volumen de elución de los microsomas en los dos experimentos anteriores (Figuras 22 a y 23 a) se evidenció un pequeño pico de proteína, al que estuvieron asociadas pequeñas cantidades de actividad LDH, MDH y 5'N (Figura 24 a). Los resultados muestran, de forma inequívoca, que los microsomas quedan retenidos en el interior de la columna.

Los microsomas retenidos no se liberan por elución con el medio B que contiene NaCl 1M (Figura 24 b). La elución posterior con cloruro de guanidinio 4 M no libera, tampoco, cantidades de proteína apreciables que hagan suponer que se liberan los microsomas retenidos. Ello sugiere que el NaCl, cuando actúa en concentraciones elevadas, modifica a los microsomas de tal manera que sufren interacciones fuertes con el soporte, probablemente de tipo hidrofóbico. Además, cuando los microsomas quedan retenidos, el fenómeno no es reversible. Ello conduce a sugerir que, la liberación de las actividades LDH y MDH por elución, observada en experimentos anteriores, con el medio B conteniendo NaCl 1M, pueda provenir de microsomas retenidos en la columna, tal y como se había supuesto anteriormente (véase 5.4.2.2.1).

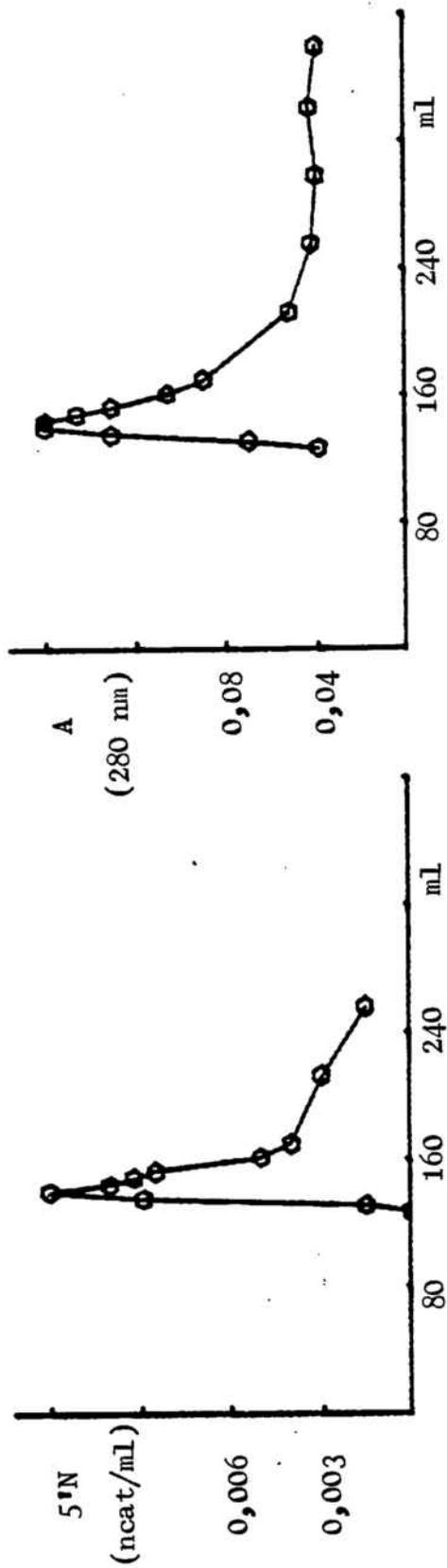
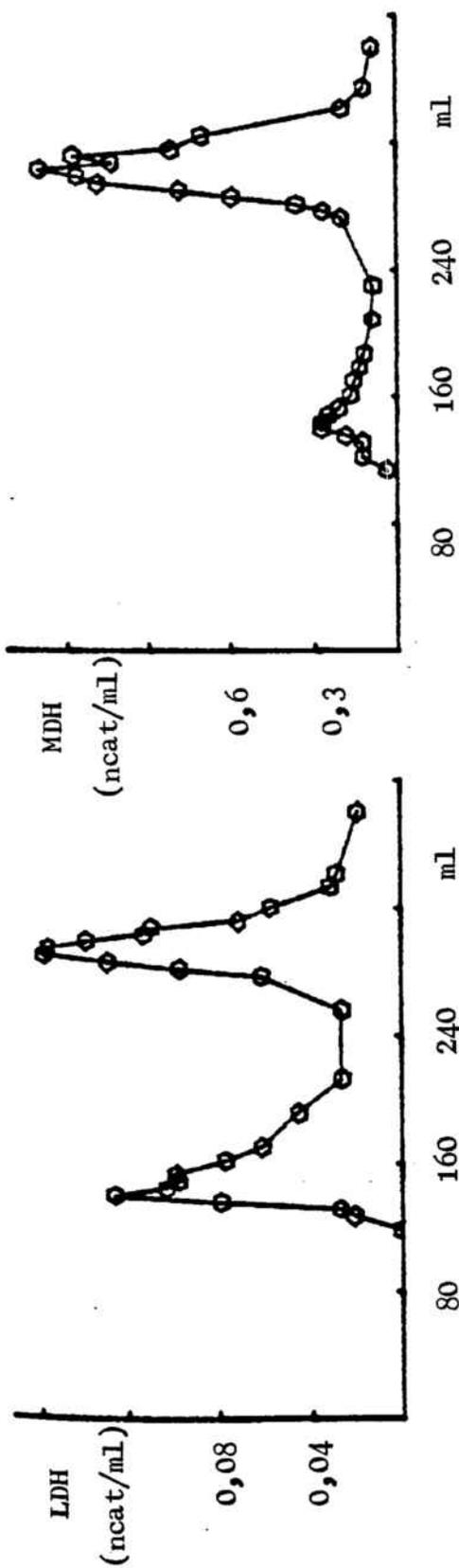


FIGURA 24.- FILTRACION DE RESIDUOS MICROSOMALES LAVADOS CON NaCl 1M, EN GEL DE SEPHAROSE CL 4B EQUILIBRADO CON EL MEDIO B. Columna K-26 (Pharmacia). Volumen de lecho 344 ml. Columna equilibrada en el medio B. La aplicación consistió en MC separados en el medio B, lavados dos veces con el medio B conteniendo NaCl 1M y suspendidos en B.

FIGURA 24 a.- ELUCION EN EL MEDIO B. La elución se efectuó con 400 ml del medio B, Fracciones de 4,3 ml. Actividades LDH, MDH y 5'N. Profetna: absorbancia a 280 nm.

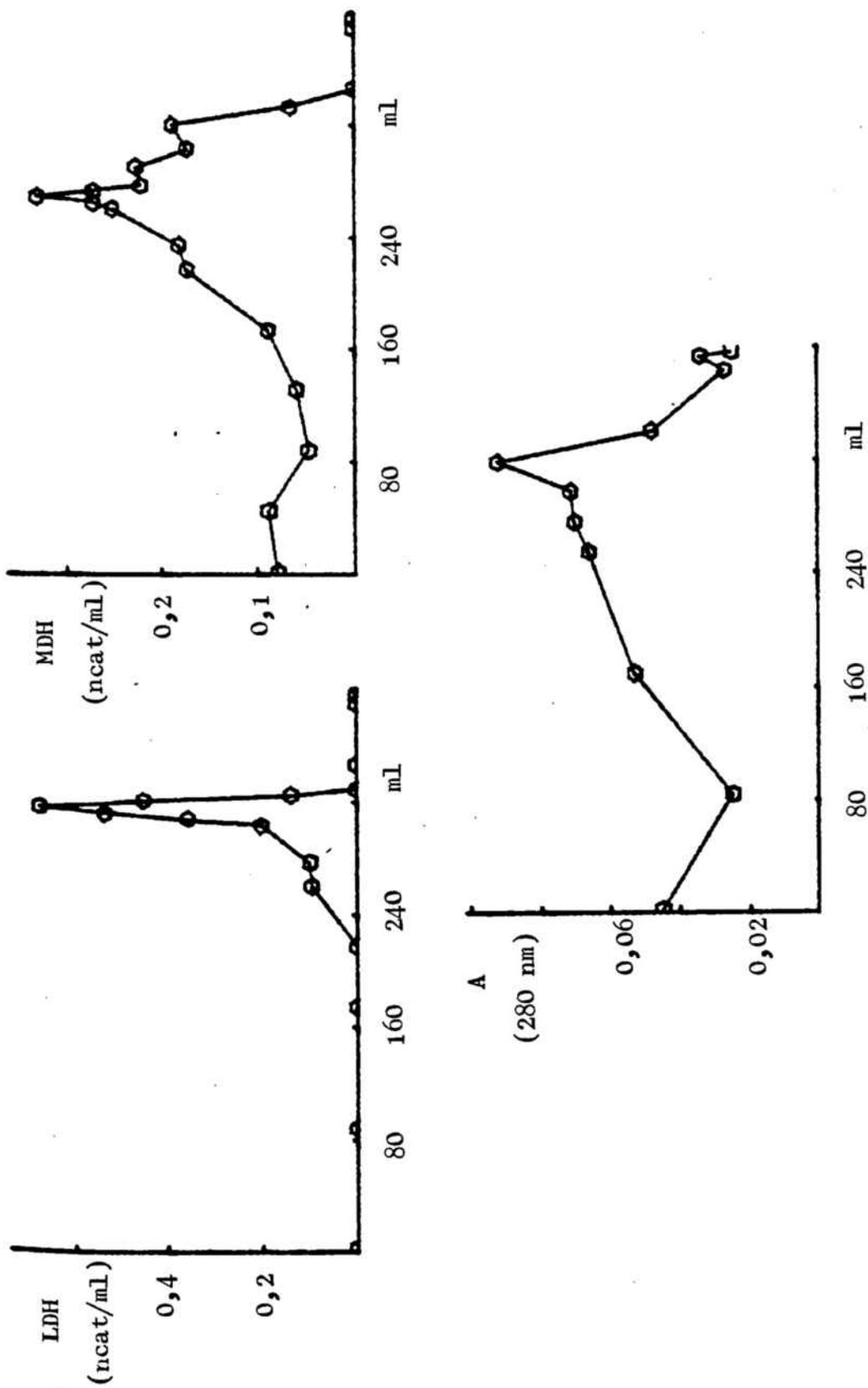


FIGURA 24 b.- ELUCION CON EL MEDIO B CONTENIENDO NaCl 1M. Una vez efectuada la elución previa con el medio B, se continuó con 400 ml del medio B conteniendo NaCl 1M. Fracciones de 4,3 ml. Actividades LDH y MDH. Proteína: absorbancia a 280 nm.

5.4.2.2.4 Filtración de los microsomas separados en medios con DMSO, en eluyentes de baja fuerza iónica

A fin de comparar el volumen de elución de los microsomas obtenidos en ausencia de DMSO con el de los microsomas obtenidos en presencia de DMSO, se filtraron éstos a través de gel de Sepharose CL 4B, equilibrado con el medio B y en las mismas condiciones descritas en los apartados anteriores.

También se sometieron a filtración a través de Sepharose CL 4B los microsomas aislados en presencia de DMSO que se habían lavado dos veces con desoxicolato 0,075 % (p/v) en el medio B. Como el tratamiento con desoxicolato origina una disminución de la cantidad de microsomas que se separan, se prefirió emplear los microsomas obtenidos en presencia de DMSO ya que el rendimiento es mayor.

De los microsomas obtenidos en presencia de DMSO 50 % (v/v) en el medio B, se tomaron dos alícuotas. Una de ellas se lavó dos veces con el medio B y se resuspendió en el medio B antes de ser aplicada a la columna. La otra, después de lavada con el medio B, se trató dos veces sucesivas con desoxicolato 0,075 % (p/v) en el medio B y el residuo, separado por ultracentrifugación, se conservó congelado a -20 °C. Antes de ser aplicado a la columna se descongeló y se resuspendió en el medio B.

5.4.2.2.4.1 Filtración de los microsomas (DMSO), previamente lavados, en eluyentes de baja fuerza iónica

La primera de las porciones mencionadas en el apartado ante-

rior, lavada dos veces con el medio B, se resuspendió en el medio B y se aplicó a la columna equilibrada en el mismo medio. La absorción a 280 nm de la aplicación de microsomas, diluida 1::50 en el medio B, fue de 0,410 A y contuvo 0,069 U/ml de 5'N.

El pico de microsomas eluyó en el volumen de 138 ml, análogo al volumen de elución de los microsomas obtenidos en ausencia de DMSO. En las fracciones de 4,3 ml recogidas, se determinaron las actividades LDH y 5'N y las absorbancias a 280 nm.

Los resultados, que aparecen en la figura 25, son análogos a los obtenidos en experimentos anteriores con los microsomas separados en ausencia de DMSO (Figuras 22. a y 23 a). Hay picos de actividad LDH y 5'N que coinciden con el pico de microsomas.

No obstante, parece que se produce una retención de microsomas en el interior de la columna que es superior a la que ocurre al trabajar con los microsomas separados en ausencia de DMSO. Ello se pone de manifiesto al comparar la absorbancia a 280 nm y la actividad 5'N de los microsomas aplicados en uno y otro caso, y el pico de microsomas eluidos (Figuras 22 a y 25). Esta retención que, en cualquier caso, no es tan acusada como cuando se somete a los microsomas a lavados con concentraciones elevadas de NaCl (véase 5.4.2.2.3), puede ser debido a que el DMSO ejerza en los microsomas efectos similares al NaCl (1M) si bien no de forma tan acusada.

La elución con el medio B conteniendo NaCl 1M tampoco provocó en esta ocasión una liberación apreciable de proteína correspondiente a los microsomas retenidos. Ello es un nuevo indicio de que la retención de las partículas no es reversible en las condiciones experimentales descritas.

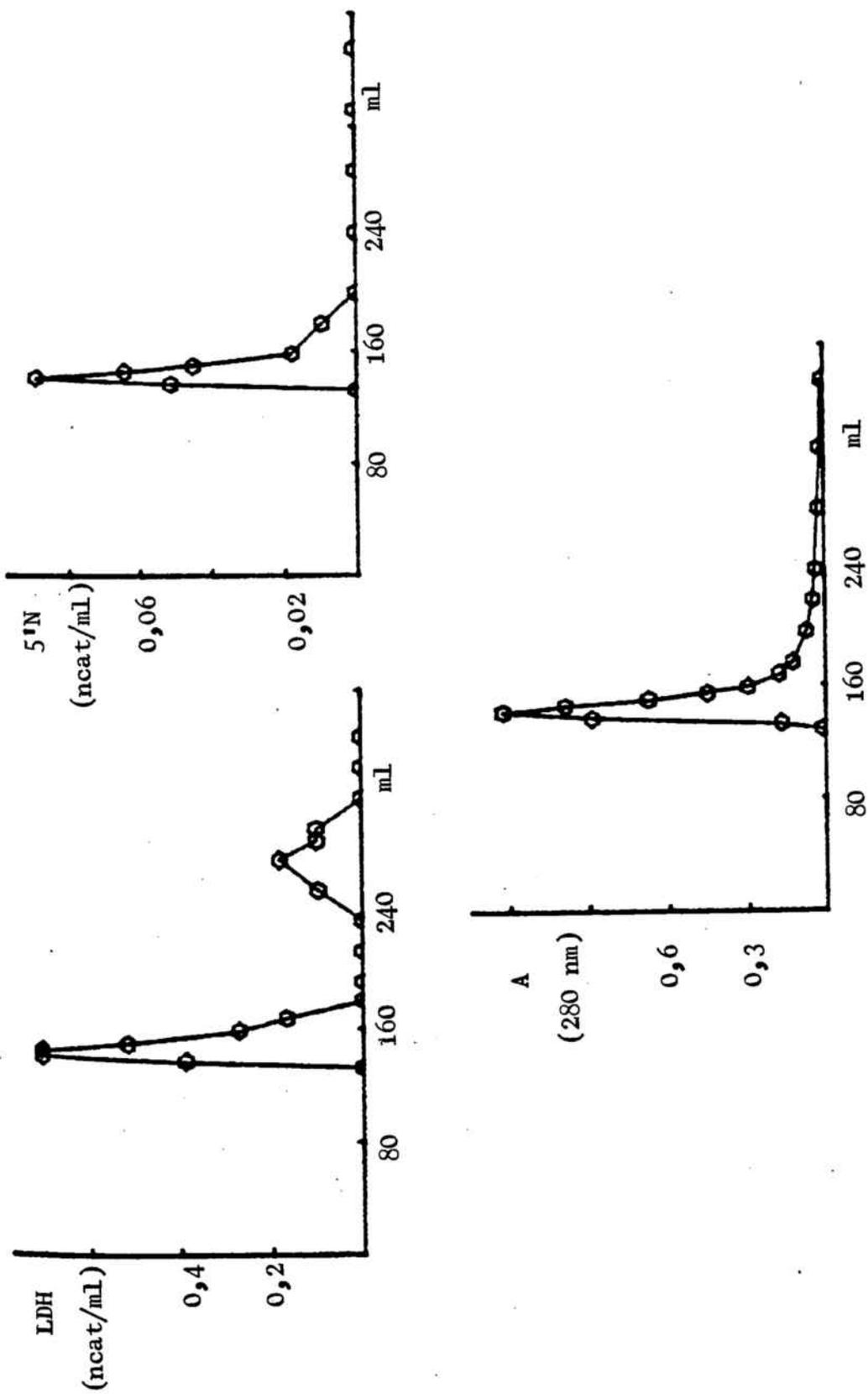


FIGURA 25.- FILTRACION DE RESIDUOS MICROSOMALES SEPARADOS EN PRESENCIA DE DMSO, EN GEL DE SEPHAROSE CL 4B EQUILIBRADO CON EL MEDIO B. Columna K-26 (Pharmacia). Volumen de lecho 344 ml. Columna equilibrada en el medio B. La aplicación consistió en microsomas aislados en DMSO 50% (v/v), lavados dos veces con el medio B y suspendidos en B. La elución se efectuó con 400 ml del medio B. Fracciones de 4,3 ml. Actividades LDH y 5'N. Proteína : Absorbancia a 280 nm.

5.4.2.2.4.2 Filtración de los microsomas (DMSO), previamente tratados con desoxicolato (0,075 %), en eluyentes de baja fuerza iónica

Después de descongelar, la segunda porción de los microsomas separados en presencia de DMSO y que fue sometida a dos tratamientos sucesivos con desoxicolato 0,075 % (p/v) en B (véase 5.4.2.2.4), se resuspendió en el medio B y se aplicó a la columna equilibrada en el mismo medio. La absorción a 280 nm de la aplicación de microsomas, diluida 1::25 en el medio B, fue de 0,430 A y contuvo 0,060 U/ml de 5'N.

El pico de microsomas se eluyó en el volumen de 138 ml, análogo al volumen de elución de los microsomas en experimentos anteriores.

En las fracciones de 4,3 ml recogidas, se determinaron las actividades LDH, MDH y 5'N, así como las absorbancias a 280 nm.

Los resultados presentados en la figura 26, son análogos a los obtenidos con los microsomas lavados con medios de baja fuerza iónica. También, ahora, aparecen picos de actividad LDH, MDH y 5'N que coinciden con el pico de microsomas.

Al comparar los picos de los microsomas obtenidos en este experimento (Figura 26) y en el experimento anterior (Figura 25) se demuestra que aunque en éste la aplicación en cuanto a absorción a 280 nm y a actividad 5'N fue menor, la elución, en cuanto a absorción a 280 nm y a actividad 5'N fue mayor. Ello indica que la retención de los microsomas en la columna es menor, quizás debido a que el efecto del DMSO ha quedado contrarrestado por la acción del tensoactivo.

Los elevados picos de actividad LDH y MDH que aparecen a volúmenes de elución más elevados (Figura 26) pueden ser de-

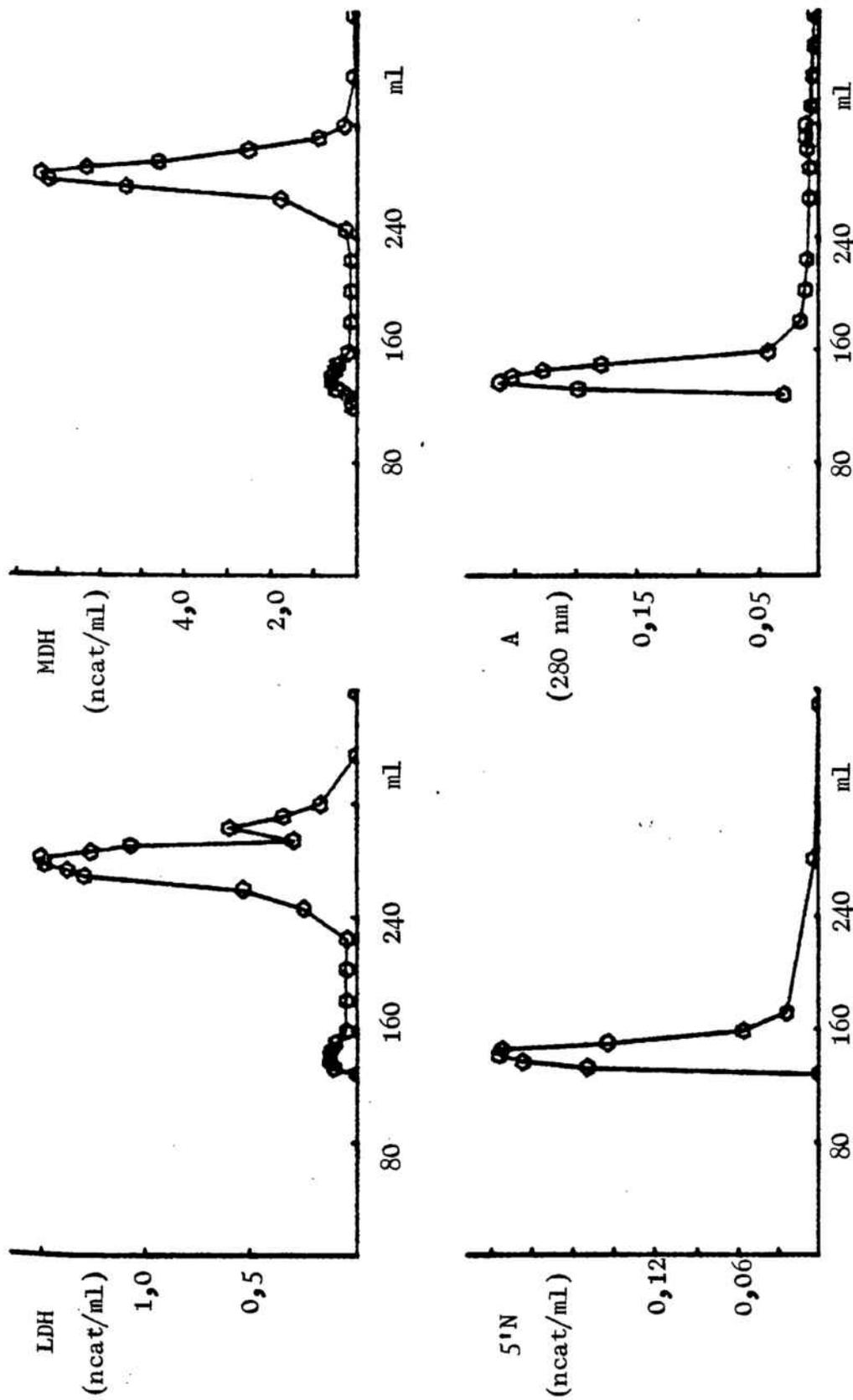


FIGURA 26.- FILTRACION DE RESIDUOS MICROSOMALES SEPARADOS EN PRESENCIA DE DMSO Y TRATADOS CON DESOXICOLATO, EN GEL DE SEPHAROSE CL 4B EQUILIBRADO CON B. Columna K-26 (Pharmacia) Volumen de lecho 344 ml. Columna equilibrada en el medio B. La aplicación consistió en microsomas aislados en IMSO 50% (v/v) en B, tratados dos veces con desoxicolato 0,075 % (p/v) en B y suspendidos en B. La elución se efectuó con 400 ml del medio B. Fracciones de 4,3 ml. Actividades LDH, MDH y 5'N. Protefna: absorbancia a 280 nm.

bidos a un efecto del detergente, aún cuando es posible que la congelación de los MC haya podido producir una mayor liberación de tales enzimas. En la tabla XLV, análoga a la tabla XLIV, se confirman estos resultados ya que parte de las actividades LDH y MDH de la aplicación de microsomas a la columna se han liberado de las membranas microsomales por lo que deben eluir a volúmenes más elevados que los microsomas. La confirmación de que esta elevada liberación es debida a la acción del detergente sobre las membranas microsomales y al efecto de la congelación en cuanto a la liberación propiamente dicha, requeriría efectuar estudios adicionales que se desvían de los objetivos del presente trabajo.

Por último, hay que indicar que la elución con el medio B que contiene NaCl 1M, puso de manifiesto, también, como en todos los experimentos anteriores, la liberación de pequeñas cantidades de actividad LDH y MDH.

5.4.2.3 PROPIEDADES ELECTRICAS. ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO

A fin de establecer si los microsomas son homogéneos en cuanto a sus propiedades eléctricas, se sometieron a un enfoque isoeléctrico preparativo en columna.

5.4.2.3.1 Enfoque isoeléctrico de residuos microsomales separados en medios que contienen DMSO

Los microsomas que se sometieron a enfoque isoeléctrico se obtuvieron por homogeneización de 2,5 g de cerebro con 21 ml de una disolución de DMSO al 50 % (v/v) en el medio B. Se es-

TABLA XLV

ACTIVIDADES LDH Y MDH EN LA APLICACION DE MICROSOMAS TRATADOS CON DESOXICOLATO Y EN LOS ELUIDOS DE UNA COLUMNA DE SEPHAROSE CL 4B

	LDH(ncat/ml)	MDH(ncat/ml)
Aplicación de MC	10,0 (100)	51,4 (100)
Sobrenadante de la aplicación de MC	9,5 (95)	38,2 (74)
Reunión de eluidos	0,43 (100)	0,46 (100)
Sobrenadante de la reunión de eluidos	0,04 (10)	0,19 (41)

Las actividades enzimáticas LDH y MDH se determinaron en la suspensión de MC tratados dos veces con desoxicolato 0,075%, que se aplicó a la columna de Sepharose CL 4B (2,6 x 64,8 cm) y en los eluidos reunidos. En ambas disoluciones se determinaron las actividades, tanto en la suspensión como en el sobrenadante que quedó después de separar los microsomas por ultracentrifugación (105.000 x g, 90 min, rotor 35 FA, 4 °C). Los valores se expresan en ncat/ml y entre paréntesis se expresan los resultados comparativos, asignando el valor 100 a las actividades de las suspensiones.

cogieron los microsomas (DMSO) para efectuar el estudio debido a que el rendimiento cuantitativo de la fracción microsomal es superior cuando se aísla en presencia de DMSO. El incremento de rendimiento permitía sugerir, por otra parte, que el subfraccionamiento de los microsomas podía dar lugar a su resolución en subfracciones heterogéneas.

Tras someter al residuo microsomal separado, a un lavado con el medio B, el nuevo residuo se suspendió en sacarosa 0,28 M. El resto del experimento se realizó como se ha descrito en métodos (véase 4.18.2).

El electroenfoque se resolvió en una única banda homogénea de microsomas (figura 27). La elución lenta de los microsomas (véase 4.18.2) condujo a un "pI" para los microsomas de 5,02. En los eluidos se determinaron las actividades LDH, MDH (oxalacetato y NADH) y MDH (malato y NAD), con resultados similares a los que aparecen en la figura 28. Los resultados de la figura 28 se obtuvieron al efectuar un experimento similar al descrito, pero en el que la elución de los microsomas fue más rápida (véase métodos 4.18.2). En este caso, el "pI" de los microsomas fue de 5,18. La diferencia entre los pI de 5,02 y 5,18 puede ser debida, en parte, a que en la elución lenta hay más posibilidad de que los microsomas enfocados experimenten un pequeño descenso debido a su propio peso; en la elución rápida este efecto es mucho más despreciable.

No fue posible efectuar la determinación de la actividad 5'N en los eluidos, ya que los anfolitos interfieren en la actividad del enzima. Aunque los anfolitos son capaces de formar complejos con iones metálicos, al igual que el EDTA, la inhibición de la actividad 5'N por ambos no se debe, probablemente, a la eliminación de ningún ión, tal como se ha demostrado con el EDTA (Mallol y Bozal 1982b), sino a interacciones enzima-reactivo.

Los resultados de la figura 28 ponen de manifiesto, en primer lugar, que los microsomas liberan actividades LDH y MDH que se desplazan hacia el cátodo a valores de pH cercanos e incluso superiores a 10. Para comprobar este extremo, se ha demostrado la ausencia de actividad enzimática que convierte el NADH en NAD en esa zona de pH; asimismo, se ha determinado

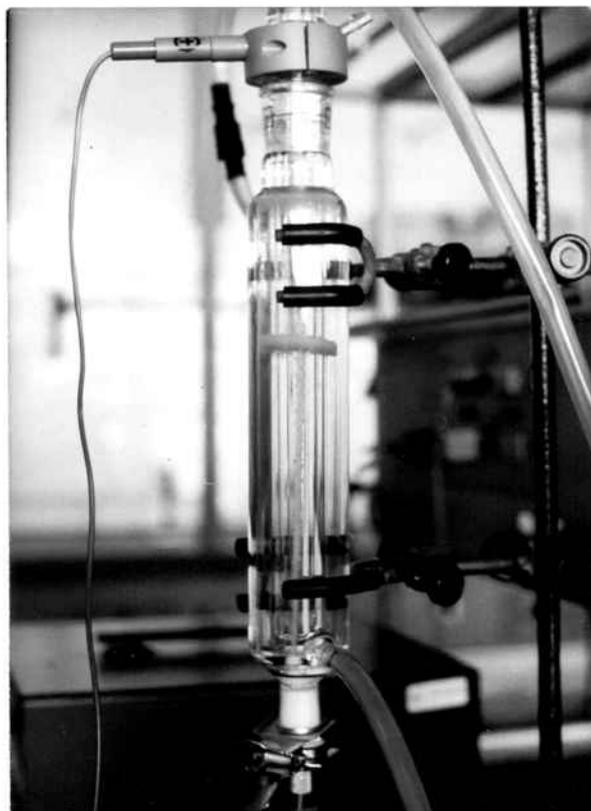


FIGURA 27.- ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO DE RESIDUOS MICROSOMALES OBTENIDOS EN PRESENCIA DE DMSO.- Los microsomas se separaron en medio de DMSO 50 % (v/v) en B, se lavaron dos veces con B y se resuspendieron en sacarosa 0,28 M. La foto se realizó a las 15 h. de comenzado el experimento, efectuado con anfolitos de margen de pH 3-10. El ánodo se encuentra en la parte superior de la columna.

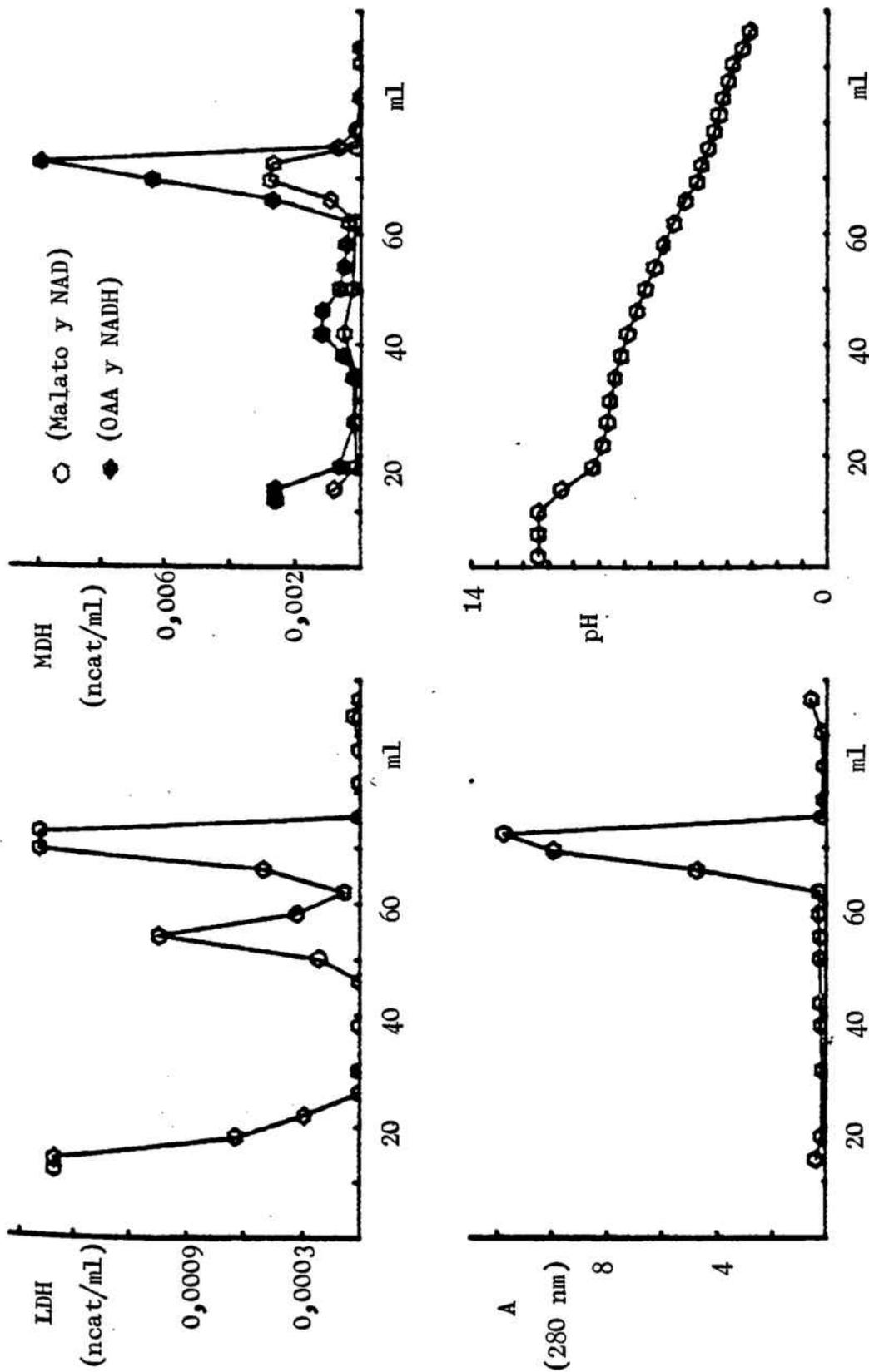


FIGURA 28.- ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO EN COLUMNA DE MICROSOMAS SEPARADOS EN MEDIOS QUE CONTIENEN DMSO. Columna 8100-1 (LKB) de 110 ml. Margen de los anfolitos 3-10. Duración del experimento 15 h. La aplicación consistió en microsomas aislados en el medio B, lavados dos veces con B y suspendidos en sacarosa 0,28 M. Fracciones de 3,1 ml. Actividades LDH, MDH (oxalacetato y NADH) y MDH (malato y NAD). Gradiente de pH determinado de forma instantánea. Protefna: absorbancia a 280 nm.

la actividad MDH con malato y NAD con objeto de confirmar que la presencia de dicha actividad no era debida a la acción de la LDH sobre el oxalacetato y el NADH (Busquets et al 1979). Los eluidos que se comentan, ricos en actividad LDH y MDH, se recogieron (entre el ml 10 y el ml 16) y se filtraron en gel de Sephadex G - 25 equilibrado con el medio B; la disolución que se recoge, denominada CAT, se empleó posteriormente en experimentos de electroforesis y de enfoque isoeléctrico analítico.

También se pone de manifiesto la coincidencia de los picos de actividad LDH y MDH con el pico de microsomas, que está comprendido entre los volúmenes de elución de 63 y de 75 ml. Estas actividades enzimáticas, no son debidas a la superposición del pico de elución de los microsomas con otros picos correspondientes a formas moleculares de LDH o de MDH que tengan su pI en esa zona. Ello se demostró reuniendo los eluidos de los microsomas (entre el ml 63 y el ml 75) y ensayando las actividades LDH y MDH antes y después de la separación de las partículas por ultracentrifugación. En la tabla XLVI se demuestra que al separar los microsomas de los eluidos se pierden casi el 100 % de la actividad LDH y más del 50 % de la actividad MDH lo que prueba que, en gran medida, las actividades LDH y MDH están ligadas a las membranas presentes en los eluidos.

El residuo de los eluidos se lavó con el medio B; el sobrenadante se sometió a electroforesis y el nuevo residuo se trató con desoxicolato 0,075 % (p/v) en B. Se determinaron las actividades LDH, MDH, ADA, GAH y PNP en el sobrenadante del tratamiento con el detergente. En la tabla XLVII se presentan los resultados obtenidos y que demuestran la presencia de todos los enzimas estudiados. También se ensayó la actividad 5'N

TABLA XLVI

ACTIVIDADES LDH Y MDH DE LOS MICROSOMAS ELUIDOS EN EL ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO

	LDH(μ cat totales)	MDH(μ cat totales)
Eluidos	0,0205	0,137
Sobrenadante de eluidos	0,0	0,062

Las actividades enzimáticas LDH y MDH se determinaron en los eluidos reunidos del electroenfoque preparativo en columna (110 ml, 8100-1 de LKB), antes y después de la separación de los microsomas por ultracentrifugación (105.000 x g, 90 min, rotor 35 FA, 4 °C). Los valores se expresan en μ cat totales presentes en la suspensión de MC y en la disolución exenta de ellos.

TABLA XLVII

ACTIVIDADES ENZIMATICAS LIBERADAS AL TRATAR CON DESOXICOLATO EL RESIDUO DE MICROSOMAS AISLADO DE LOS ELUIDOS DEL ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO EN COLUMNA

Enzima	μ cat totales en el lavado
LDH	0,017
MDH	0,100
ADA	0,00021
GAH	0,00043
PNP	0,00017
5'N	0,0000465

Los microsomas separados por ultracentrifugación de los eluidos del enfoque isoeléctrico preparativo en columna (110 ml, 8100-1 de LKB), se lavaron con el medio B. El residuo de microsomas lavados se trató con desoxicolato 0,075 % (p/v) en el medio B. La determinación de actividades enzimáticas se llevó a cabo en el sobrenadante obtenido después del tratamiento con el detergente. Los resultados se expresan en μ cat totales presentes en la disolución enzimática.

en la suspensión de microsomas en desoxicolato 0,075 % (p/v) en B, que resultó ser de 0,00202 μ cat totales. Con ello se demuestra que al eliminar los anfolitos, la actividad 5'N se recupera, como sucedía al eliminar el EDTA; ello sugiere, de nuevo, que el efecto del EDTA y de los anfolitos sobre el enzima sea análogo.

5.4.2.3.2 Caracterización de las formas LDH y MDH que se separan en el transcurso del enfoque isoelectrico. Comparación con las formas LDH y MDH obtenidas en la fracción soluble de cerebro de rata

Las actividades enzimáticas LDH y MDH que se obtienen cerca del cátodo por el enfoque isoelectrico se caracterizaron por electroforesis y enfoque isoelectrico analítico y se analizó la presencia de formas análogas de LDH y MDH en la fracción soluble obtenida tanto en presencia como en ausencia de DMSO.

5.4.2.3.2.1 Electroforesis

La caracterización de las formas moleculares de LDH y MDH se llevó a cabo por electroforesis zonal en geles de poliacrilamida y por comprobación de su posible movilidad anódica (habitual) y catódica.

5.4.2.3.2.1.a Lactato deshidrogenasa (LDH)

Las disoluciones aplicadas en las electroforesis, contuvieron aproximadamente 0,004 μ cat/ml de LDH en todos los prepa-

rados. Cuando las actividades fueron superiores, las disoluciones se diluyeron convenientemente. El volumen de aplicación no excedió nunca de los 0,3 ml.

Como ya se ha descrito, el residuo de los microsomas presentes en los eluidos del enfoque isoeléctrico, se sometió a un lavado con el medio B y el nuevo residuo de microsomas lavados se trató con desoxicolato 0,075 % (p/v) en el medio B. Los sobrenadantes procedentes de ambos tratamientos se sometieron a electroforesis de movilidad anódica. En la figura 29 se muestran los ferogramas obtenidos que muestran la presencia de cuatro formas moleculares de la LDH. Estos resultados coinciden con los obtenidos con los sobrenadantes de sonicación o tratamiento con detergentes de los "microsomas lavados" obtenidos en ausencia de DMSO (véase 5.2.11.4 y figuras 9-11). También fué sometida a electroforesis zonal de movilidad anódica la disolución rica en actividad LDH que se enfoca cerca del cátodo (véase 5.4.2.3.1). La disolución se filtró en gel de Sephadex G-25, equilibrado en el medio B, y constituyó la denominada disolución CAT. En el ferograma que se obtuvo, no se puso de manifiesto la presencia de ninguna banda de actividad LDH. Por el contrario, cuando se aplicó la misma disolución y se sometió a una electroforesis zonal de movilidad catódica (4 mA/tubo, 1,5 h) en el ferograma correspondiente apareció una banda con actividad LDH cercana al origen (Figura 30).

El sobrenadante del lavado con B del residuo microsomal separado de los eluidos también se sometió a electroforesis zonal de movilidad catódica. En la figura 31 se compara el ferograma obtenido con esta disolución y con la disolución CAT; en este caso, la electroforesis se llevó a cabo a 3 mA/tubo, 3 h. En ambos casos se observa la presencia de una única banda, aunque en el sobrenadante del lavado con B existe un halo

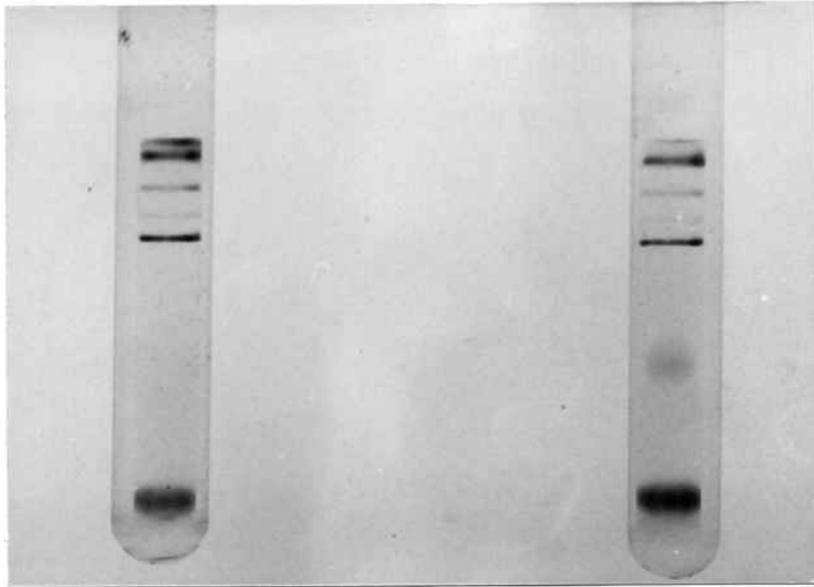


FIGURA 29.- ELECTROFORESIS ZONAL ANODICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA LDH LIBERADA POR LAVADO CON B O POR TRATAMIENTO POSTERIOR CON DESOXICOLATO, DE LOS MICROSOMAS ELUIDOS DEL ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO.- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la LDH liberada por lavado con B o por tratamiento posterior con desoxicolato 0,075 % (p/v) en B de los microsomas aislados de los eluidos del enfoque isoelectrico preparativo en columna (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

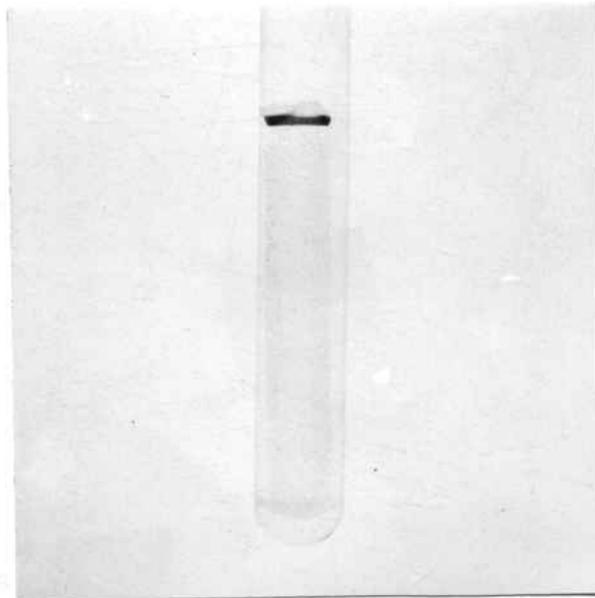


FIGURA 30.- ELECTROFORESIS ZONAL CATODICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA LDH DE LA DISOLUCION CAT QUE SE ENFOCA CERCA DEL CATODO EN EL ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO.- Ferograma obtenido tras revelado específico, de la LDH de la disolución CAT. La electroforesis catódica se llevó a cabo a 4 mA/gel, 1,5 h.

detrás de la banda. No obstante, este halo desapareció cuando se aplicó la mezcla de ambas disoluciones (Figura 31 b). Cuando en lugar del sobrenadante del lavado con B se aplicó el sobrenadante del tratamiento con desoxicolato los resultados fueron análogos.

Para comprobar si esta banda de movilidad catódica estaba presente en la fracción soluble obtenida en presencia o en ausencia de DMSO, se aplicaron las disoluciones concentradas de ambos tipos de fracción soluble obtenidos como se ha descrito en métodos (véase 4.3). La aplicación fue de 100 μ l y para ambas disoluciones, los ferogramas demostraron la presencia de una banda de actividad LDH (Figura 32). La electroforesis se llevó a cabo durante 3 h a 3mA/tubo.

Los sobrenadantes procedentes de la sonicación de los microsomas separados en ausencia o en presencia de DMSO, se sometieron, también, a electroforesis zonal de movilidad catódica. Los resultados en ambos casos fueron similares a los obtenidos para el sobrenadante del lavado con B de los microsomas de los eluidos (Figura 31 a). No obstante, cuando la aplicación consistió en la mezcla de los sobrenadantes de sonicación con las correspondientes fracciones solubles, el ferograma se resolvió en una banda nítida; así, los resultados son similares a los obtenidos cuando se aplicó la mezcla del sobrenadante del lavado con B de los microsomas separados de los eluidos y de la disolución CAT (Figura 31 b).

Los ferogramas correspondientes a las electroforesis zonales con movilidad anódica de la fracción soluble obtenida en presencia de DMSO y del sobrenadante de sonicación de los "microsomas lavados" aislados en presencia de DMSO mostraron la presencia de cuatro bandas de actividad LDH. Estas cuatro bandas son idénticas a las obtenidas con la fracción soluble

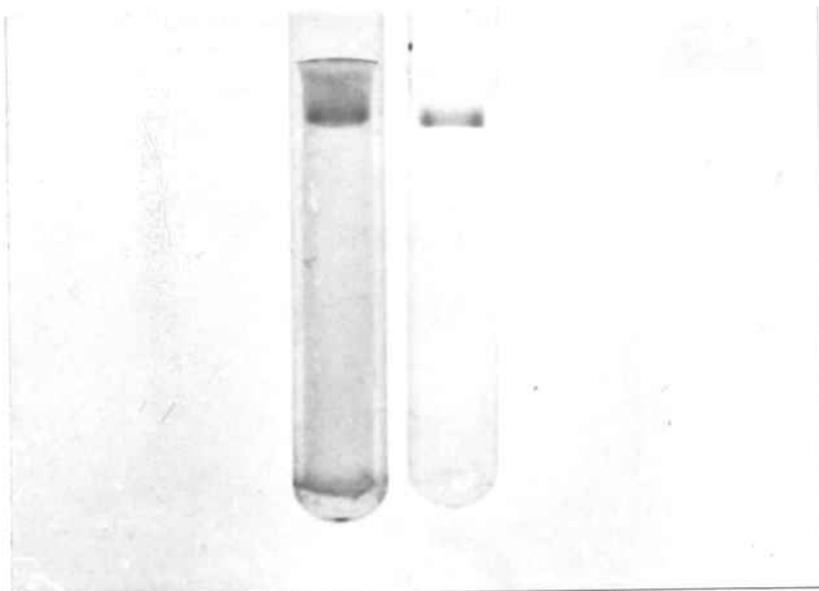


FIGURA 31 a.- ELECTROFORESIS ZONAL CATODICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA LDH LIBERADA POR LAVADO CON B DE LOS MICROSOMAS ELUIDOS DEL ENFOQUE ISOELECTRICO, Y DE LA LDH DE LA DISOLUCION CAT.- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la LDH liberada por lavado con B de los MC aislados de los eluidos del enfoque isoelectrico , y de la LDH de la disolución CAT (de izquierda a derecha en el orden mencionado). La electroforesis catódica se llevó a cabo a 3 mA/gel, 3 h.

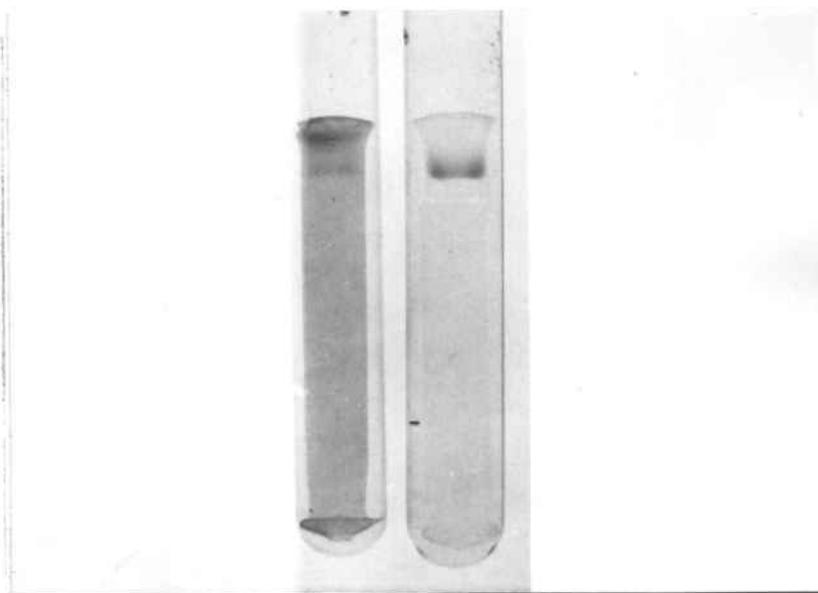


FIGURA 31 b.- ELECTROFORESIS ZONAL CATODICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA LDH LIBERADA POR LAVADO CON B DE LOS MC ELUIDOS DEL ENFOQUE ISOELECTRICO Y DE LA LDH DE LA MEZCLA DE ESTE LAVADO CON LA DISOLUCION CAT.- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la LDH liberada por lavado con B de los MC eluidos del enfoque isoelectrico, y de la LDH de la mezcla de este lavado con la disolución CAT (de izquierda a derecha en el orden mencionado). La electroforesis catódica se llevó a cabo a 3 mA/gel, 3 h.

separada en ausencia de DMSO y con el sobrenadante de sonicación de los "microsomas lavados" aislados en ausencia de DMSO (Figura 9).

En conjunto, todo parece indicar que las formas moleculares de la LDH de cerebro de rata son cinco, como habían propuesto Simon et al (1977) y como se puso de manifiesto en el presente trabajo por electroforesis en tiras de acetato de celulosa (Figura 9 b). No obstante, en las condiciones en las que se efectuaron las electroforesis zonales ; en este trabajo sólo se pusieron de manifiesto cuatro de dichas formas que tenían movilidad anódica; en las mismas condiciones de pH, la quinta forma molecular se demostró que tenía movilidad catódica. Además, la banda de LDH de movilidad catódica, se libera, en parte, de las membranas microsomales y se desplaza hacia el cátodo y no se modifica, aparentemente, en los experimentos de enfoque isoelectrico.

Por otra parte, los resultados de caracterización electroforética de la LDH descritos en el presente capítulo y en el capítulo 4.2.10, parecen demostrar que son cinco las formas moleculares de LDH que se obtienen en la fracción soluble separada tanto en ausencia como en presencia de DMSO; también son cinco las formas moleculares que se liberan de los microsomas aislados en ausencia o en presencia de DMSO.

5.4.2.3.2.1.b Malato deshidrogenasa (MDH)

Las disoluciones aplicadas en las electroforesis contuvieron aproximadamente 0,01 μ cat/ml de MDH en todos los preparados. Cuando las actividades fueron superiores, las disolucio-

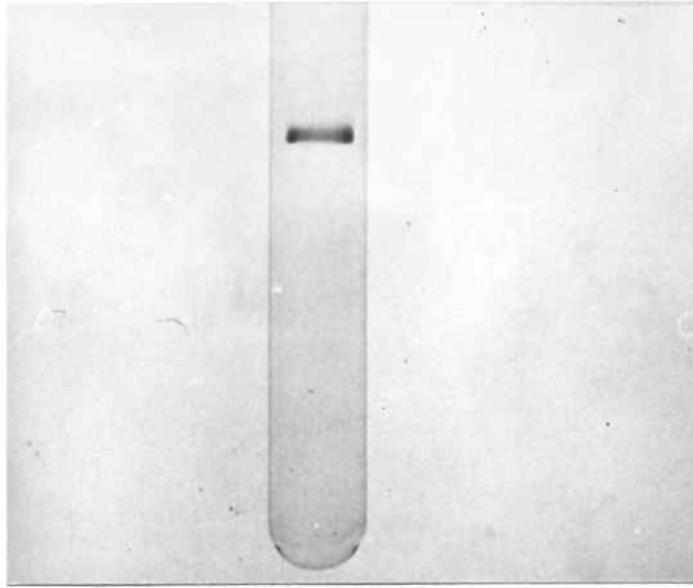


FIGURA 32.- ELECTROFORESIS ZONAL CATODICA DE LA LDH OBTENIDA EN LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA.- Ferograma obtenido tras revelado específico, de la LDH de la fracción soluble obtenida en ausencia de DMSO. La electroforesis catódica se llevó a cabo a 3 mA/gel, 3h. Cuando se sometió a estudio la fracción soluble obtenida en presencia de DMSO, el resultado fue idéntico.

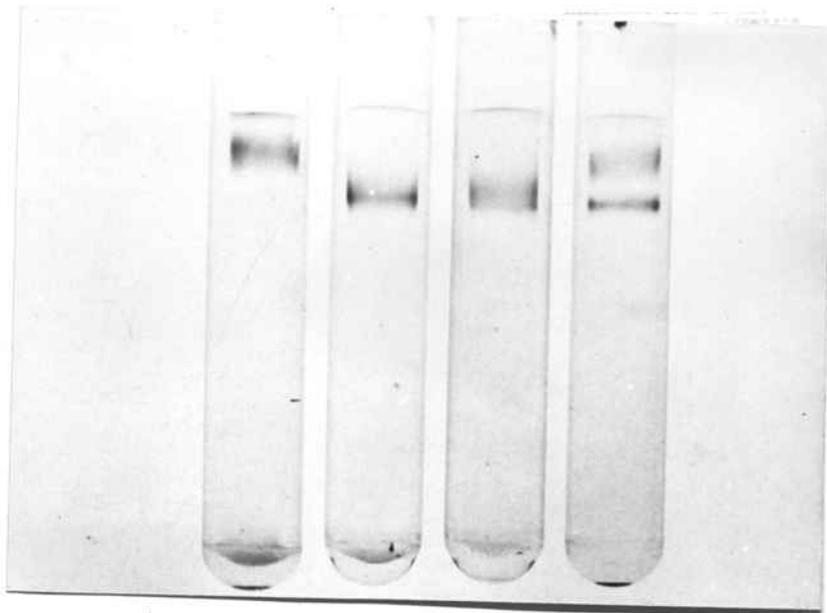


FIGURA 33.- ELECTROFORESIS ZONAL ANODICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA MDH DE LA DISOLUCION CAT, Y DE LA MDH LIBERADA POR LAVADO CON B O POR TRATAMIENTO CON DESOXICOLATO DE LOS MC ELUIDOS DEL ENFOQUE ISOELECTRICO PREPARATIVO.- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la MDH de la disolución CAT, de la liberada por lavado con B o tratamiento posterior con desoxicolato 0,075 %, de los microsomas aislados de los eluidos del enfoque isoelectrico y de la mezcla de los dos primeros (de izquierda a derecha en el orden mencionado).

nes se diluyeron convenientemente. El volumen de aplicación no excedió nunca de 0,3 ml.

En ninguno de los casos estudiados, a diferencia de lo que ocurría con la LDH, se ha podido demostrar la existencia de una forma molecular de la MDH con movilidad catódica, ni aun al emplear la disolución CAT (véase 5.4.2.3.2.1.a).

Al igual que con la LDH, se sometieron a electroforesis zonal de movilidad anódica, los sobrenadantes del lavado con B y del posterior tratamiento con desoxicolato de los microsomas procedentes de los eluidos del electroenfoque (véase 5.4.2.3.1). En la figura 33 se muestran los ferogramas obtenidos para ambos sobrenadantes, así como para la disolución CAT, tras el revelado específico de los geles de poliacrilamida. Con la disolución CAT se obtuvo una banda de actividad MDH de menor movilidad que la banda de actividad MDH obtenida con las otras dos disoluciones. Se demostró que ambas bandas eran distintas al mezclar la disolución CAT con la del sobrenadante del lavado con B de los microsomas aislados de los eluidos del electroenfoque (Figura 33).

Para comprobar si esta banda de menor movilidad, obtenida con la disolución CAT estaba presente en la fracción soluble separada en presencia de DMSO, se aplicó la disolución concentrada de dicha fracción soluble. La aplicación fue de 100 μ l y el ferograma demostró la presencia de una sola banda correspondiente a la de mayor movilidad de la figura 33. Este resultado fue idéntico al obtenido con la fracción soluble aislada en ausencia de DMSO (Figura 12). Por aplicación de los sobrenadantes obtenidos por sonicación de los microsomas separados en presencia de DMSO no se consiguió una banda nítida en los ferogramas correspondientes. No obstante, al mezclar dicho sobrenadante de sonicación con la fracción soluble ob-

tenida en presencia de DMSO se obtuvo en la electroforesis una banda nítida de actividad MDH que correspondió a la de mayor movilidad de la figura 33.

Los resultados anteriores ponen de relieve que la actividad MDH presente en la disolución CAT, que no coincide con ninguna forma molecular de MDH presente en las restantes disoluciones sometidas a caracterización electroforética, pudiera haberse formado por interacción con los anfolitos durante el enfoque isoeléctrico. Las restantes disoluciones, incluidas las fracciones solubles obtenidas en ausencia o en presencia de DMSO, muestran, por electroforesis en geles de poliacrilamida, ferogramas en los que sólo aparece una banda de actividad MDH; esta banda es de mayor movilidad que la obtenida con la disolución CAT. No se ha demostrado la existencia de ninguna forma molecular MDH de movilidad catódica como ocurría con la LDH.

En los ferogramas correspondientes a electroforesis anódica en tiras de acetato de celulosa de la fracción soluble obtenida en presencia de DMSO y del sobrenadante de sonicación de los "microsomos lavados" aislados en presencia de DMSO mostraron la presencia de dos bandas de actividad MDH. Estas dos bandas son idénticas a las obtenidas con la fracción soluble separada en ausencia de DMSO y con el sobrenadante de sonicación de los "microsomos lavados" aislados en ausencia de DMSO (Figura 12).

5.4.2.3.2.2 Enfoque isoeléctrico analítico en placas de agarosa

Para demostrar si el desplazamiento de una forma molecular de la LDH y también de la MDH hacia el cátodo en el experimento de enfoque isoeléctrico preparativo (véase 5.4.2.3.1) es debido a que dichas formas tienen un pI muy elevado, se realizaron experimentos de enfoque isoeléctrico analítico en placas de agarosa.

5.4.2.3.2.2.a Lactato deshidrogenasa (LDH)

Cuando se aplicaron por triplicado 50 μ l de la disolución CAT (véase 5.4.2.3.1) en una placa de agarosa confeccionada con anfolitos cuyo intervalo de pH era 3-10 y se desarrolló el enfoque isoeléctrico, se separó una banda próxima a la zona del cátodo y fue imposible la determinación de su pI. Cuando se efectuó la misma aplicación en una placa de agarosa confeccionada con anfolitos cuyo intervalo de pH era 8-10,5, el resultado, previo revelado específico, consistió en una banda de pI 9,4 (Figura 34). Las aplicaciones se hicieron a distintas alturas de la placa para comprobar que la banda de LDH se había enfocado y que había ausencia de interacciones con los anfolitos. En el electroenfoque preparativo en columna, la disolución CAT se enfocó a un pI de 10,5, valor que solo es indicativo ya que el margen de pH de los anfolitos empleados fue 3-10.

También se sometió a electroenfoque analítico la fracción soluble de cerebro de rata (véase 4,3) que se dializó 12 h frente a glicina 1%. Se aplicaron 10, 25 y 50 μ l de la fracción soluble en distintas zonas de la placa, que se confeccio-

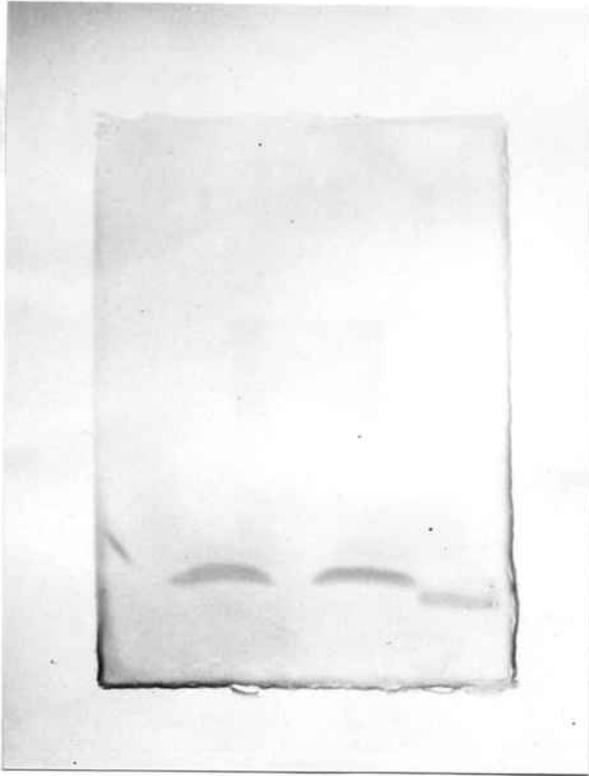


FIGURA 34.- ENFOQUE ISOELECTRICO ANALITICO DE LA LDH DE LA DISOLUCION CAT.- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la LDH de la disolución CAT. Anfolitos de margen de pH 8-10,5. Las aplicaciones fueron de 50 μ l y a distintas alturas de la placa.



FIGURA 35.- ENFOQUE ISOELECTRICO ANALITICO DE LA LDH DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA.- Ferogramas obtenidos tras revelado específico, de la LDH de la fracción soluble de cerebro de rata obtenida en el medio B. Anfolitos de margen de pH 3-10. Las aplicaciones fueron de 10, 25 y 50 μ l y a distintas alturas de la placa.

nó con anfolitos cuyo intervalo de pH fue de 3-10. Al efectuar el revelado específico de LDH se obtienen al menos, siete bandas de actividad de pI 7,75; 7,4; 6,45; 6,4; 6,3; 5,5; y 4,95. Aparece otra banda débil, enfocada a pI 8,0 (Figura 35).

Como se demuestra, en la fracción soluble no se obtiene una banda de actividad LDH a pI tan alcalino como la que se obtiene con la disolución CAT. No obstante, la caracterización electroforética demostró que la banda de la disolución CAT es idéntica a una forma molecular LDH presente en la fracción soluble (véase 5.4.2.3.2.1.a). Así pues, es posible que el tiempo de enfoque, que es mayor en el caso del electroenfoque preparativo, ejerza algún efecto sobre dicha forma molecular de LDH, que permita su desplazamiento hacia el cátodo. Es de destacar, en el mismo sentido que, por enfoque isoeléctrico analítico de las formas LDH de la fracción soluble aparecen más bandas que las que corresponden a las cinco formas del enzima obtenidas, habitualmente, por electroforesis. Ello podría ser debido a una mejor resolución del método de enfoque isoeléctrico o a interacciones del enzima con los anfolitos (Haglund 1975, Catsimpoilas 1975).

5.4.2.3.2.2.b Malato deshidrogenasa (MDH)

Al aplicar por duplicado 50 μ l de la disolución CAT (véase 5.4.2.3.1) a una placa de agarosa confeccionada con anfolitos cuyo intervalo de pH se halla entre 3 y 10, y efectuar el enfoque isoeléctrico, no se consigue el enfoque de ninguna banda de actividad MDH. Cuando la misma aplicación se lleva a cabo en una placa de agarosa confeccionada con anfolitos de

margen de pH entre 8 y 10,5, al efectuar el revelado específico de MDH aparecen dos zonas difusas cercanas al cátodo y situadas a distintas zonas de la placa (Figura 36). Como además, las aplicaciones se habían efectuado a distintas zonas de la placa, se deduce que dicha forma molecular de MDH presente en la disolución CAT no se enfoca y es presumible que se vaya desplazando al cátodo conforme avanza el enfoque isoelectrónico.

También se sometió a electroenfoque analítico la fracción soluble de cerebro de rata (véase 4.3) que se dializó 12 h frente a glicina 1 %. Se aplicaron 25 y 50 μ l de la fracción soluble a distintas zonas de la placa que se confeccionó con anfolitos de pH entre 3 y 10. El revelado específico (Figura 37) proporciona una banda intensa a pI 5,8, otras dos débiles coincidentes con las dos más intensas de actividad LDH (Figura 35) y además, aparece una banda difusa en una zona de pH comprendida entre 8,0 y 8,5. En conjunto, se ponen de manifiesto dos bandas de actividad MDH que coinciden, en número, con las que se obtienen por electroforesis en tiras de acetato de celulosa (Figura 12).

La banda más intensa (Figura 37), enfocada a pI de 5,8, debe corresponder a la única que aparece en las electroforesis zonales en geles de poliacrilamida de la fracción soluble de cerebro (Figura 12). Por su parte, la banda difusa (Figura 37), análoga a la que aparece al someter al electroenfoque analítico la disolución CAT (Figura 36), es probable que se desplace hacia el cátodo; esta hipótesis permitiría explicar el hecho de que en el electroenfoque preparativo de los MC se obtuviera actividad MDH en la zona de pH de 10,5 (véase 5.4.2.3.1). Estos resultados se pueden explicar sugiriendo interacciones específicas de esta forma molecular de la MDH

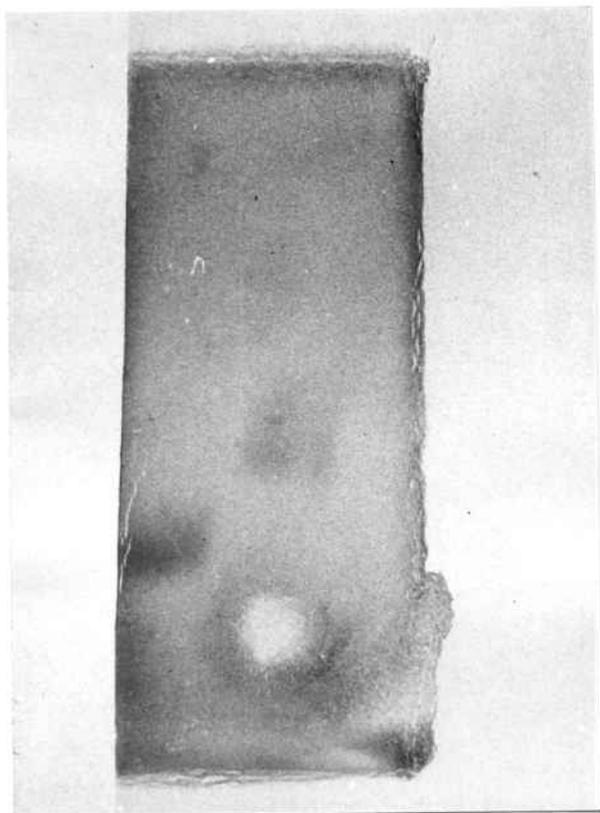


FIGURA 36.- ENFOQUE ISOELECTRICO ANALITICO DE LA MDH DE LA DISOLUCION CAT.- Ferrograma obtenido tras revelado específico, de la MDH de la disolución CAT. Anfolitos de margen de pH 8-10,5. Las aplicaciones fueron de 50 μ l y a distintas alturas de la placa. Las flechas señalan las bandas de actividad MDH.



FIGURA 37.- ENFOQUE ISOELECTRICO ANALITICO DE LA MDH DE LA FRACCION SOLUBLE DE CEREBRO DE RATA.- Ferrograma obtenido tras revelado específico, de la MDH de la fracción soluble de cerebro de rata obtenida en el medio B. Anfolitos de margen de pH 3-10. Las aplicaciones fueron de 25 y 50 μ l y a distintas alturas de la placa.

con los anfolitos (Haglund 1975, Catsimpoolas 1975), que hubieran modificado de forma notable al enzima; hay que recordar que la forma molecular de la MDH presente en la disolución CAT (véase 5.4.2.3.1) se caracteriza en una banda, que no coincide con ninguna otra forma de MDH, por electroforesis zonal anódica en geles de poliacrilamida. Aunque dicha forma se desplaza hacia zonas de pI alcalinas en el electroenfoque preparativo, su movilidad es anódica y no se pone de manifiesto su presencia por electroforesis zonal de movilidad catódica, por revelado específico de los geles de poliacrilamida (véase 5.4.2.3.2.1.b).

5.4.2.4 PROPIEDADES MORFOLOGICAS. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Con la técnica de microscopía electrónica se efectuó la caracterización ultraestructural de la fracción microsomal, tanto cruda como después de ser sometida a distintos lavados con el medio A, a sonicación o a tratamiento con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A. También se compararon las micrografías de los microsomas separados en presencia de DMSO con las correspondientes a los microsomas aislados en ausencia de DMSO.

Las micrografías se obtuvieron de cortes finos de las muestras fijadas e incluidas, a partir de tres bloques distintos de las preparaciones tomadas a distintos niveles de los residuos microsomales.

5.4.2.4.1 Micrografías de residuos microsomales recién aislados

El residuo microsomal separado por ultracentrifugación del sobrenadante post-mitocondrial se trató como se describió en métodos (véase 4.23).

Las micrografías mostraron la presencia de dos tipos de vesículas con distinto comportamiento en cuanto a su opacidad a los electrones. Las vesículas con contenido claro fueron en su mayoría de forma circular, con diámetros comprendidos entre 90 y 270 nm. Las vesículas opacas, de forma también circular, fueron menores y sus diámetros estuvieron comprendidos entre 45 y 200 nm (Figuras 38, 39, 40). En ocasiones se observó la presencia de vesículas claras, de gran tamaño, formadas a partir de las membranas de retículo endoplasmático (RE) (Figura 41). Se observó, también, en ocasiones, la presencia de fragmentos de membranas del RE que no formaban vesículas y de fragmentos de membranas mielínicas (Figuras 42, 43). En ningún caso se observó la presencia de mitocondrias en la fracción microsomal aislada en ausencia de DMSO por el método habitual (véase 4.3).

5.4.2.4.2 Micrografías de residuos microsomales lavados

Los microsomas, se sometieron a tres lavados con el medio A antes de efectuar los tratamientos previos a su observación micrográfica. El residuo lavado se trató tal como se describió en métodos (véase 4.23).

Los resultados obtenidos demostraron que no existen diferencias apreciables entre las vesículas presentes en la fracción

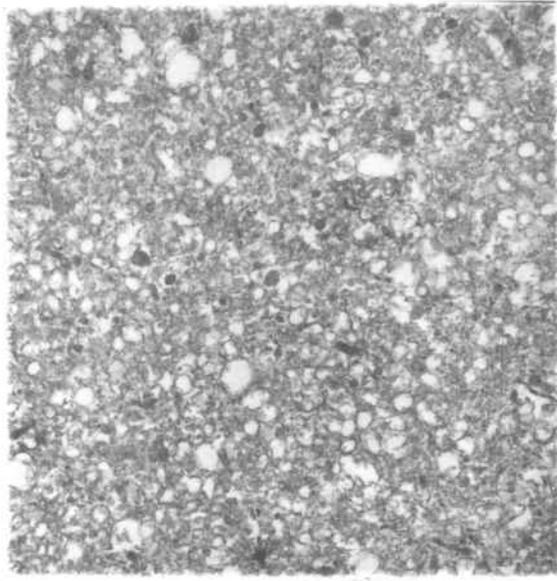


FIGURA 38.- 13.500 X

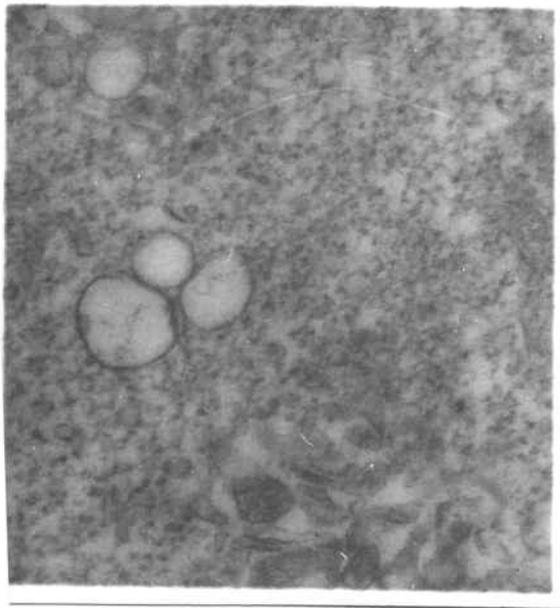


FIGURA 39.- 50.000 X

FIGURAS 38 y 39.- MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE LA FRACCION MICROSOMAL OBTENIDA COMO SE DESCRIBIO EN METODOS (Véase 4.3). La fracción se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23).

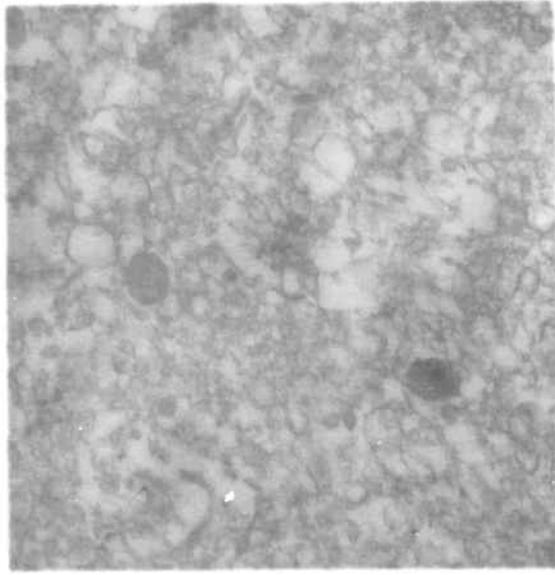


FIGURA 40.- 25.500 X

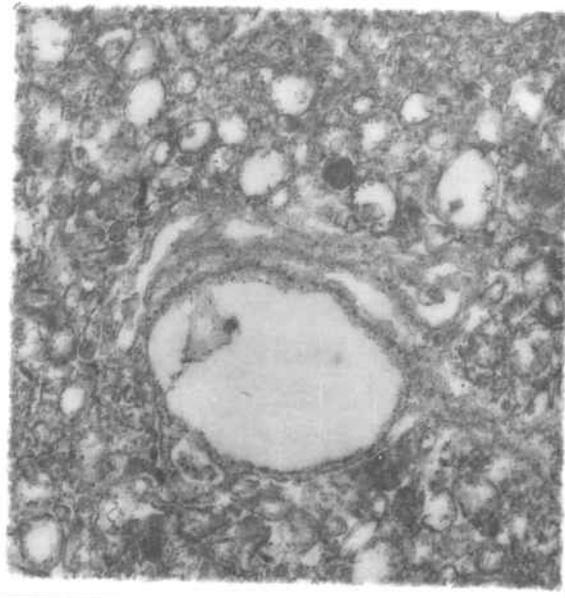


FIGURA 41.- 35.000 X

FIGURAS 40 y 41.- MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE LA FRACCION MICROSOMAL OBTENIDA COMO SE DESCRIBIO EN METODOS (véase 4.3).- La fracción se procesó como se describió en métodos (véase 4.23).

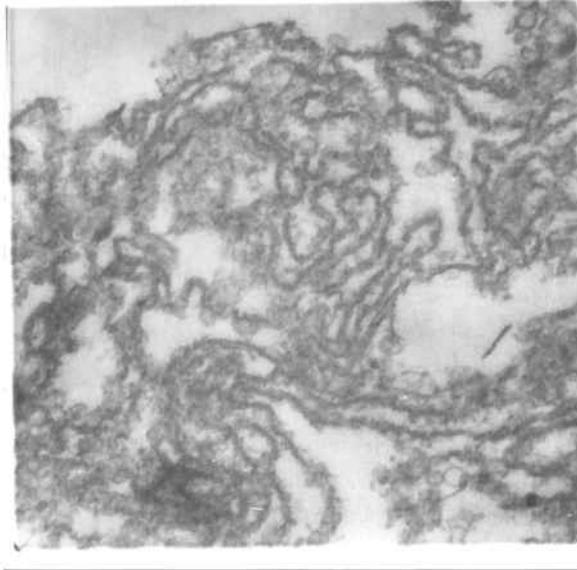


FIGURA 42.- 35.000 X

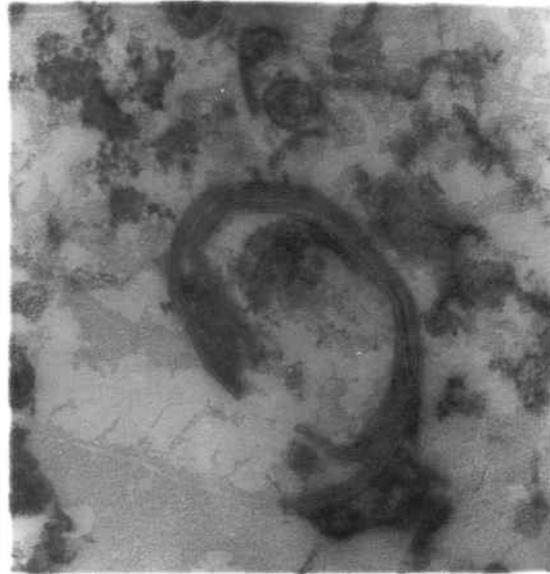


FIGURA 43.- 60.000 X

FIGURAS 42 y 43.- MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE LA FRACCION MICROSOMAL OBTENIDA COMO SE DESCRIBIO EN METODOS (Véase 4.3).- La fracción se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23).

microsomal lavada, tal como se muestra en la figura 44 obtenida con los "microsomas lavados".

5.4.2.4.3 Micrografías de residuos microsomales
sonicados

Los "microsomas lavados" se sonicaron (18 micrones, 30 s tres veces) y el residuo de microsomas que se separa se trató como habitualmente (véase 4.23).

Las micrografías obtenidas de esta fracción muestran la presencia de vesículas como ocurre con los microsomas crudos (Figura 45). En ningún caso se observó la desorganización de tales vesículas a causa de la sonicación; no obstante, es posible que las vesículas que se observaron en las micrografías no se correspondan con las originales presentes en los microsomas crudos o en los lavados con A.

5.4.2.4.4 Micrografías de residuos microsomales
tratados con desoxicolato

Los microsomas se trataron por dos veces consecutivas con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A y el residuo de microsomas se trató como habitualmente (véase 4.23).

Las micrografías del residuo muestran una desorganización acusada de las membranas microsomales (Figura 46) que puede atribuirse a la presencia del detergente. Sin embargo, Wei - hing et al (1972), en micrografías obtenidas de residuos microsomales de hígado de rata tratados con desoxicolato 0,075

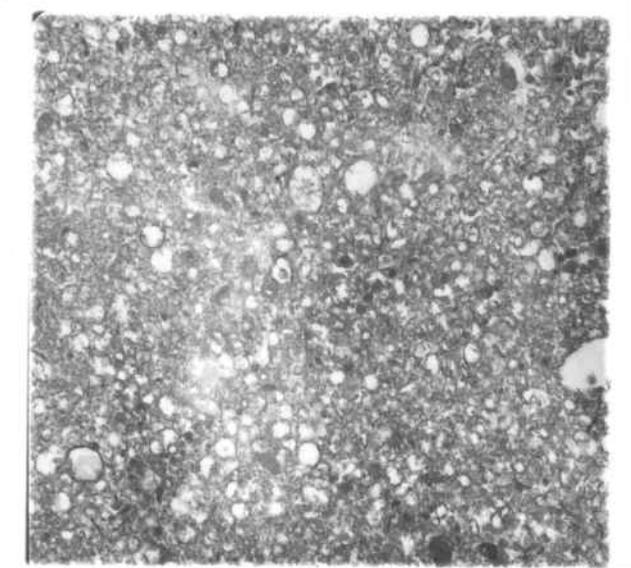


FIGURA 44.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA FRACCION MICROSOMAL LAVADA CON A.- La fracción microsomal obtenida en la forma habitual (Véase 4.3), se lavó tres veces con el medio A y se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23). 13.500 X.

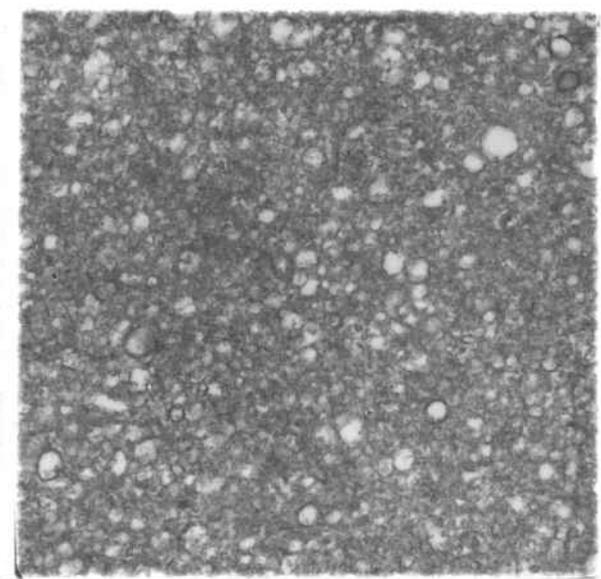


FIGURA 45.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA FRACCION MICROSOMAL SONICADA EN A.- La fracción microsomal obtenida en la forma habitual (Véase 4.3), se sonicó (18 micrones, 30 s., tres veces) en el medio A y se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23). 13.500 X.

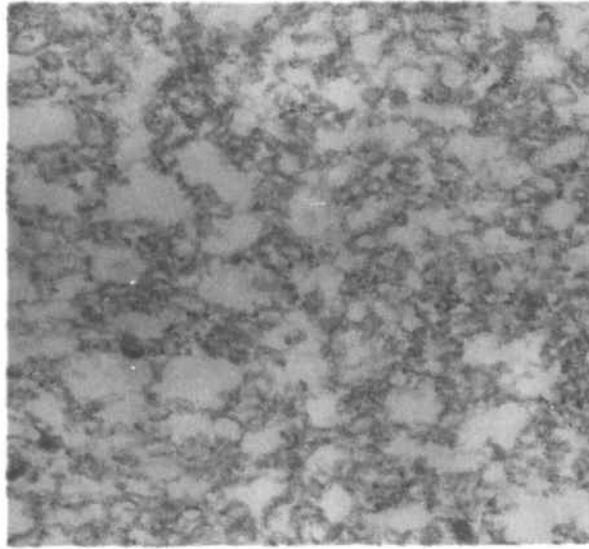


FIGURA 46.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA FRACCION MICROSOMAL TRATADA CON DESOXICOLATO 0,075 % .- La fracción microsomal aislada en la forma habitual (Véase 4.3), se trató dos veces con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A y se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23). 44.500 X.

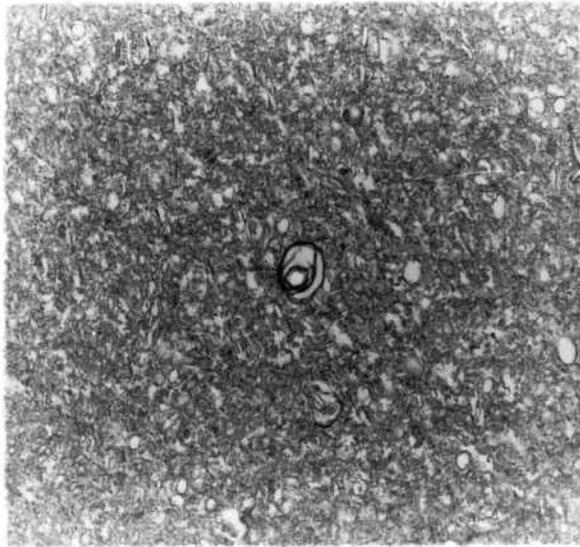


FIGURA 47.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA FRACCION MICROSOMAL TRATADA CON DESOXICOLATO 0,075 %.- La fracción microsomal aislada en la forma habitual (Véase 4.3), se trató una vez con desoxicolato 0,075 % (p/v) en A y se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23). 13.500 X.

% demuestran la presencia de vesículas, sin indicios de desorganización de las membranas. Ello puede ser debido a un efecto distinto del detergente sobre los microsomas de ambos orígenes (hígado y cerebro) o bien, a que el efecto del detergente sea estadístico y no afecte por igual a todas las vesículas. Esta última suposición, que es compatible con la manera de efectuar los tratamientos con el detergente, se ve confirmada, en principio, al observar la presencia de vesículas en determinadas zonas del residuo microsomal de cerebro de rata que sólo se había tratado una vez con desoxicolato (Figura 47).

5.4.2.4.5

Micrografías de residuos microsomales
aislados en medios que contienen DMSO

Los microsomas separados de homogeneizados de cerebros de rata en DMSO 50 % (v/v) en el medio A, se lavaron dos veces con A y con el residuo de microsomas (DMSO) lavados se procedió tal como se ha descrito en métodos (véase 4.23).

Las micrografías muestran la presencia del mismo tipo de vesículas que las que aparecen cuando los MC se aíslan en ausencia de DMSO (Figuras 48 y 49, 52 y 53). Aunque parece que la proporción de vesículas opacas es mayor en el caso de los microsomas (DMSO), debe tenerse en cuenta que la opacidad de tales vesículas varía. Así, se ponen de manifiesto unas vesículas semiopacas, algunas de las cuales parecen mitocondrias y son de tamaño algo superior a las vesículas totalmente opacas (Figuras 52 y 53). En la figura 50 se aprecia claramente la presencia de una de tales vesículas junto a un cuerpo de Marinesco (Shochet 1972). En un apartado anterior (véa-

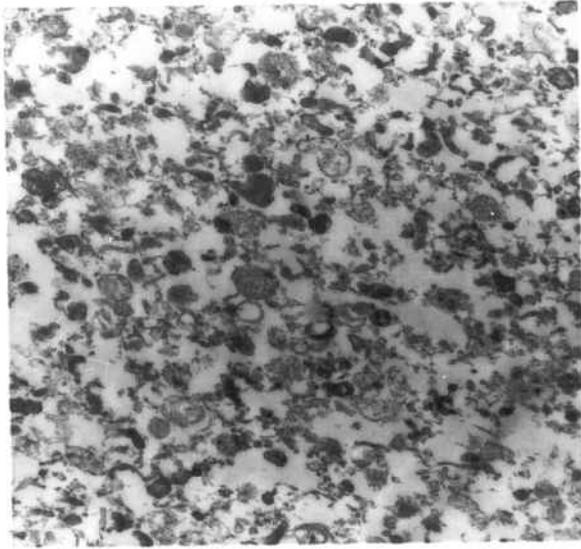


FIGURA 48.- 13.500 X.

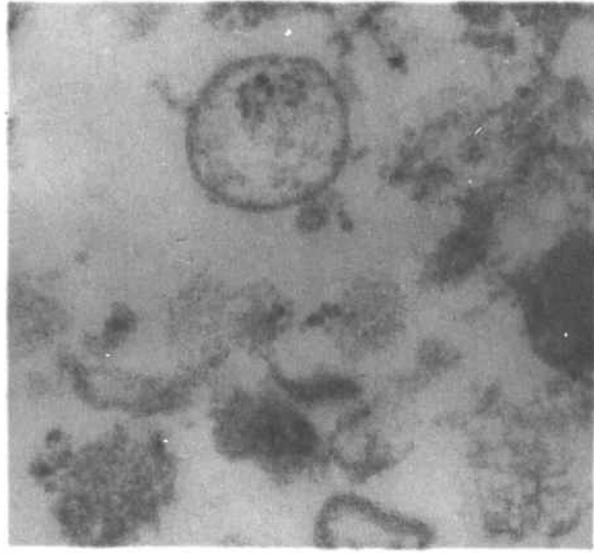


FIGURA 49.- 84.500 X.

FIGURAS 48 y 49.- MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE LA FRACCION MICROSOMAL SEPARADA EN MEDIOS CONTENIENDO DMSO.- La fracción microsomal se obtuvo en DMSO 50 % (v/v) en A, se lavó tres veces con A y se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23).

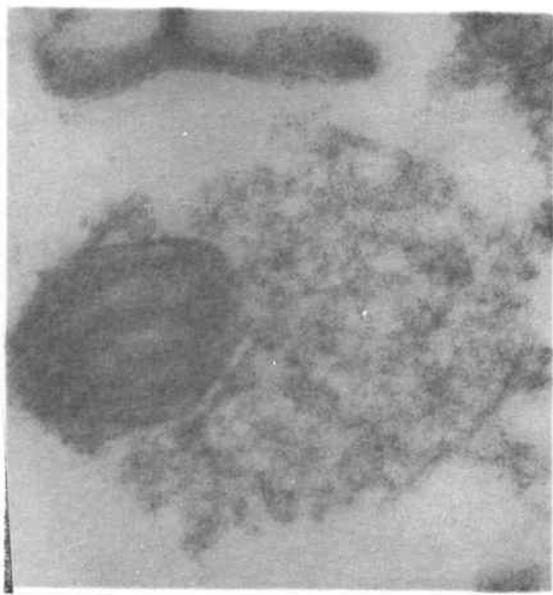


FIGURA 50.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA FRACCION MICROSOMAL SEPARADA EN MEDIOS CONTENIENDO DMSO.- La fracción microsomal se obtuvo en DMSO 50 % (v/v) en A; se lavó tres veces con A y se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23). 140.000 X.

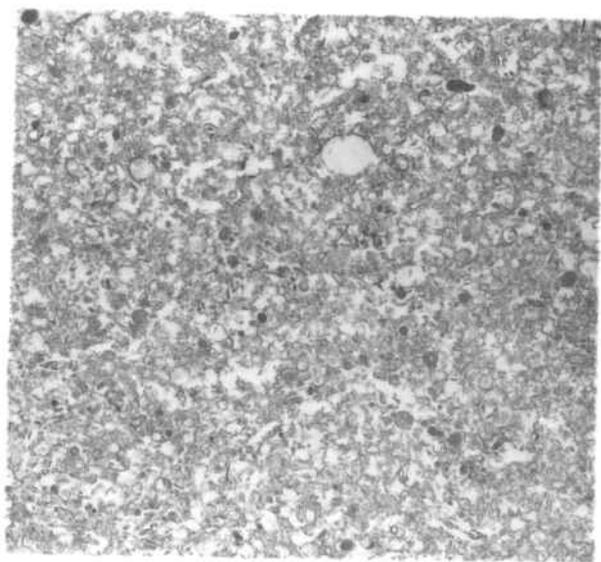


FIGURA 51.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA FRACCION MICROSOMAL FILTRADA A TRAVES DE GEL DE SEPHAROSE CL 4B.- La fracción microsomal lavada con A, se filtró en una columna de Sepharose CL 4B equilibrada con A. El pico de microsomas eluidos se reunió y el residuo se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23). 9.500 X.

se 5.4.1.4.1) se ha demostrado que la fracción microsomal separada en presencia de DMSO no está contaminada de forma especial por orgánulos subcelulares distintos a los que se aíslan en la fracción microsomal separada en ausencia de DMSO. Es posible, por tanto, que este tipo de vesículas con apariencia de mitocondrias corresponda a las vesículas claras de los MC aislados en ausencia de DMSO, si bien su estructura ha podido ser alterada por el DMSO.

5.4.2.4.6 Micrografías de residuos microsomales separados después de la filtración en gel de Sepharose CL 4B

Los microsomas aislados en ausencia o en presencia de DMSO, se resuelven en una fracción única al ser sometidos a centrifugación isopícnica en Percoll, a filtración en gel de Sepharose CL 4B y en el enfoque isoeléctrico. Las micrografías electrónicas correspondientes a los residuos microsomales separados de los eluidos procedentes de la filtración en gel de Sepharose CL 4B, pueden permitir el comprobar si la resolución de los MC en un solo pico, por filtración en gel, se corresponde con una homogeneidad de tamaño de las vesículas en las micrografías.

5.4.2.4.6.1 Microsomas aislados en el medio habitual (sin DMSO)

Los microsomas obtenidos por homogeneización de cerebros de rata en el medio A, se lavaron con A y se filtraron en gel de Sepharose CL 4B equilibrado con A. Los eluidos correspondientes al pico de microsomas se recogieron y el residuo separa-

do por ultracentrifugación se trató como se describió en métodos (véase 4.23).

La micrografía correspondiente (Figura 51) demuestra que la fracción de microsomas eluída es heterogénea en cuanto al tamaño y a la opacidad de las vesículas.

5.4.2.4.6.2 Microsomas aislados en medios que contienen
DMSO

Los microsomas aislados de homogeneizados de cerebro de rata en DMSO 50 % (v/v) en el medio A, se lavaron con A y se filtraron en gel de Sepharose CL 4B equilibrado con A. Los eluidos correspondientes al pico de microsomas se recogieron y, con el residuo separado por ultracentrifugación, se procedió como habitualmente (véase 4.23).

Las micrografías del residuo (Figuras 52 y 53) muestran que las vesículas no son homogéneas en tamaño ni en su opacidad, como ocurrió con los eluidos de los microsomas aislados en ausencia de DMSO (véase apartado anterior 5.4.2.4.6.1).

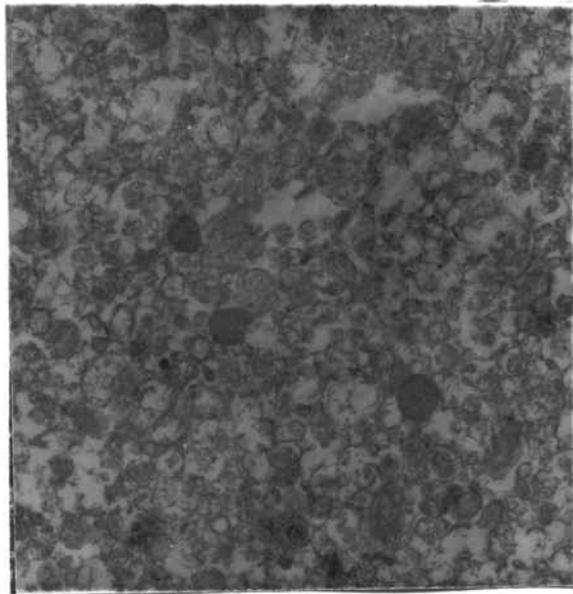


FIGURA 52.- 17.000 X.

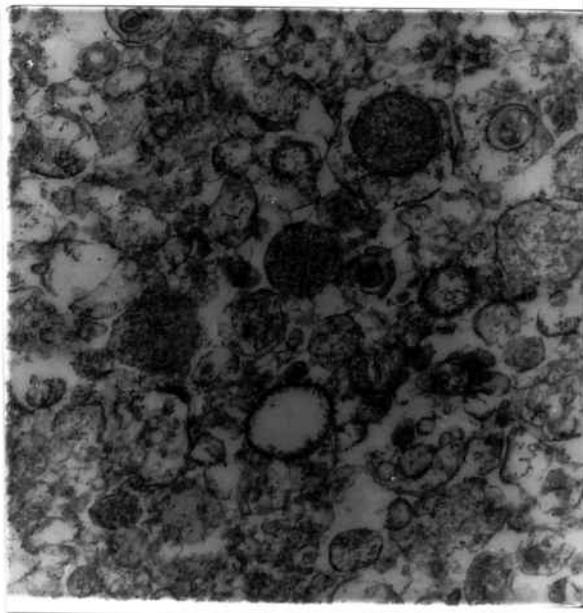


FIGURA 53.- 35.000 X.

FIGURAS 52 y 53.- MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE LA FRACCION MICROSOMAL AISLADA EN MEDIOS QUE CONTIENEN DMSO Y FILTRADA EN GEL DE SEPHAROSE CL 4B.- La fracción microsomal separada en DMSO 50 % (v/v) en A, se lavó con A y se filtró en una columna de Sepharose CL 4B equilibrada con A. El pico de microsomas eluidos se reunió y el residuo se procesó como se describió en métodos (Véase 4.23).

5.4.3

DISCUSION

Los experimentos descritos en el presente capítulo permiten profundizar en el conocimiento de la fracción microsomal del tejido cerebral de rata. De Duve (1964) y , posteriormente, Reid (1967) asignaron el término a la fracción que sedimenta a fuerzas centrífugas superiores a 100.000 x g y que no representa a ningún orgánulo subcelular concreto, al menos en el tejido hepático. La interpretación de estos autores parece, en principio, aplicable a la fracción microsomal del tejido cerebral de rata, la cual varía cuantitativamente al modificar la relación de homogeneización (ml/g tejido) (véase 5.4.1). No obstante, Kiang et al (1978), al homogeneizar el tejido cerebral de rata con nueve volúmenes de disolución 0,3 M de sacarosa, que era a la vez 1 mM en NaH_2PO_4 , 0,1 mM de EDTA y pH 7,5, en un homogeneizador cuya holgura fué de 0,2 mm, separaron los microsomas que estaban contaminados por mitocondrias e incluso por terminales nerviosos. En los microsomas aislados en el presente trabajo, con una relación de 6 ml/g no se ha detectado la presencia de mitocondrias en las micrografías de la fracción (véase 5.4.2.4.1 y 5.4.2.4.2). Es pues posible que al variar la relación o el medio de homogeneización, varíen las propiedades de sedimentación de las mitocondrias y quizás de otros orgánulos subcelulares.

La fracción microsomal también varía cuantitativamente cuando se modifica la constante dieléctrica del medio de homogeneización. Con ello, se obtienen fracciones solubles en las que varía la proporción de ácidos nucleicos. No obstante, los cambios más acusados, en cuanto a la cantidad de microsomas separados, se obtienen por homogeneización de los cerebros de rata en medios conteniendo DMSO y cuya constante dieléctrica es muy similar a la del medio A; cuando el DMSO es del 50 %

(v/v), la cantidad de fracción microsomal aislada es unas tres veces superior a la que se obtiene en el medio A. Se ha discutido la importancia de la constante dieléctrica del medio en cuanto a la posibilidad de que fuera un parámetro de gran importancia en estudios de enzimología. Maurel (1978) ha demostrado que las interacciones electrostáticas, aparentemente, no se modifican por variaciones de la constante dieléctrica del medio; así, las variaciones cinéticas observadas al modificar dicho parámetro, son más fácilmente explicables al considerar interacciones hidrofóbicas con el medio, efecto directo del medio sobre los puentes de hidrógeno internos, modificación del grado de hidratación e interacción del medio con el centro activo del enzima, entre otros efectos. Es muy probable que las conclusiones de Maurel (loc. cit.), que entre otros medios usó el DMSO, sean aplicables aquí para explicar la diferente cantidad de microsomas obtenidos al variar el medio. El DMSO, también, es un agente que forma complejos estables con los iones de los metales de transición (Meek et al 1960) e interacciona con lípidos y compuestos hidrocarbonados además de con las proteínas, especialmente con determinadas proteínas de las células epiteliales, por lo que es usado como vehículo en pomadas de uso tópico (Sneider et al 1971, Rodermund y Klingmueller 1972, David 1972, Index Merck 1981). De cualquier forma, el efecto del DMSO es distinto al que ejerce el polietilenglicol, el cual modifica los componentes microsomales de forma que su precipitación es posible efectuarla a bajas gravedades en la centrífuga, 8.000xg, 10 min (Van der Hoeven 1981).

Parte de la fracción microsomal de cerebro, como se demostró en las micrografías electrónicas, está constituida por unas vesículas que no son opacas y cuyo origen procede, probablemente, de la soldadura de los fragmentos de membranas celulares producida en la homogeneización (Figuras 38 - 43) . Ca-

be pensar que el DMSO pueda afectar tal vesiculización por todos los efectos comentados. No obstante, en las micrografías de residuos microsomales aislados en presencia de DMSO se observa la presencia mayoritaria de vesículas cerradas (Figuras 48 - 50, 52 - 53), aunque también es cierto que las preparaciones de los microsomas en estos experimentos se llevaron a cabo, finalmente, en el medio A (véase 5.4.2.4.5). Las micrografías muestran una mayor proporción de vesículas opacas en los MC obtenidos en presencia de DMSO que en los que se separan en ausencia del reactivo. También se observa una gradación en cuanto a la opacidad de las vesículas presentes en los microsomas (DMSO) que no se daba en los microsomas (sin DMSO). Es posible que el DMSO haya alterado las vesículas claras presentes en los MC (sin DMSO) dándoles el aspecto de vesículas semiopacas, con apariencia de mitocondrias, que se muestran en los MC (DMSO). Por otra parte, se ha demostrado que el efecto del DMSO es parcialmente reversible por lo que, en gran parte, se debe ejercer durante la homogeneización. El DMSO que se añadió después de la homogeneización en el medio A, no fué tan efectivo como cuando se incluyó en el medio de homogeneización.

Al comparar las actividades enzimáticas lactato deshidrogenasa (LDH), malato deshidrogenasa (MDH), adenosina desaminasa (ADA), guanina aminohidrolasa (GAH) y purinnucleósido fosforilasa (PNP) liberadas por los microsomas aislados en medios que pueden contener o no DMSO, se pone de manifiesto que todos los enzimas exhiben un comportamiento similar; la liberación de enzimas fue proporcional a la cantidad de microsomas separados, que fue mayor cuando se preparaba el homogeneizado en medios que contenían DMSO. Al comparar las actividades de los enzimas marcadores de orgánulos subcelulares, los resultados fueron similares. Los microsomas de hígado, separados por la técnica

habitual o por tratamiento con polietilenglicol (50 % v/v) del sobrenadante post-mitocondrial, mostraron patrones enzimáticos similares (Van der Hoeven 1981). En los microsomas de cerebro de rata se comprobó que la fracción microsomal separada en presencia de DMSO no estaba contaminada de forma específica por orgánulos subcelulares distintos, cualitativa y cuantitativamente, a los que contaminaban la fracción microsomal aislada en ausencia de DMSO. El resultado permite sugerir que no hay presentes mitocondrias en los MC (DMSO), en contraposición a lo que parecen indicar las micrografías correspondientes (Figuras 50, 52, 53). Si se tratase de mitocondrias, tales orgánulos exhibirían menor tamaño del que exhiben, habitualmente, en cerebro de rata y contendrían enzimas distintos de la glutamato deshidrogenasa que fue el que se determinó como marcador de la fracción. Así pues, es probable, como se ha discutido anteriormente en este mismo apartado, que lo observado en las micrografías corresponda a vesículas cuya opacidad proceda de la interacción del DMSO sobre sus membranas.

En cuanto a la presencia de enzimas marcadores, se pone de manifiesto que la fosfatasa del 6-P- α -D-glucosa y la pirofosfatasa del pirofosfato de tiamina, se hallan en muy poca cantidad en los microsomas de cerebro de rata, a pesar de que el primero de los mencionados, es un enzima marcador de la fracción microsomal de tejido hepático (Gallardo 1979). La actividad de la catalasa es prácticamente nula en la fracción microsomal de cerebro aislada en ausencia o en presencia de DMSO, por lo que, prescindiendo de las que tienen apariencia de mitocondrias, las vesículas opacas que se observan en las micrografías de ambas fracciones (Figuras 38-53) no pueden corresponder a peroxisomas. Hasta un cierto tamaño, tales vesículas se hallan comprendidas en el tamaño correspondiente a

las vesículas pleomórficas (70 - 300 nm de diámetro) y a las vesículas sinápticas opacas y grandes ("LOV") de los nervios purinérgicos (80 - 180 nm de diámetro) (Burnstock 1981). Estas vesículas aparecen rodeadas de un halo (loc. cit.) que puede haberse perdido durante el proceso de aislamiento de los microsomas. Aunque no se discute su procedencia, la presencia de vesículas opacas se ha demostrado en subfracciones microsomales de cerebro de rata (Tamai et al 1974, Kiang et al 1978) y en la fracción microsomal de pulmón de rata (Capdevilla et al 1975). En la fracción microsomal de cerebro de buey se ha demostrado la presencia de membranas y de vesículas sinápticas (Kakiuchi et al 1981). Otra posibilidad es que las vesículas opacas correspondan a lisosomas cuyo contenido se muestra denso frente a los electrones, o gránulos de secreción que se han descrito en cerebro (Palade 1959, De Duve 1959, Novikoff y Essner 1962, Rhodin 1963, Freeman 1964, Hoffer 1968).

La caracterización de los microsomas por determinación de su densidad de flotación en Percoll, de su tamaño de partícula, por filtración en gel de Sepharose CL 4B, o de su pI aparente, por enfoque isoeléctrico, ha demostrado que la fracción se comporta como si fuese homogénea, tanto si se han aislado en medios que contienen DMSO como en su ausencia. La imposibilidad del subfraccionamiento de tales microsomas por las técnicas comentadas no ha permitido asignar las actividades LDH, MDH, ADA, GAH, PNP y 5'N a uno o a ambos tipos de vesículas, claras y opacas, que son las que se observan predominantemente en las micrografías de la fracción microsomal.

La densidad de flotación en Percoll de los microsomas de cerebro de rata aislados, tanto en ausencia como en presencia de DMSO, fue muy pequeña y la concentración de Percoll que se usó

fue del 10 %. En experimentos realizados con homogeneizados de tejido hepático de rata, Blume (1979) utilizó una disolución de Percoll del 50 % para la separación de mitocondrias y de microsomas; estos últimos se separaron al efectuar la centrifugación isopícnica (100.000 x g, 45 min, rotor 60 Ti), muy cerca del fondo del tubo de ultracentrífuga y agrupados en una sola banda. Estos resultados indican una semejanza con los obtenidos en el presente trabajo debido a que los microsomas de cerebro de rata se resuelven en una sola banda. No obstante, los microsomas de cerebro poseen una densidad de flotación mucho menor que la de los de hígado de rata; ambos tipos de microsomas son cualitativamente distintos y cabe suponer que la proporción de lípidos es mayor en los microsomas de cerebro.

Al trabajar con la fracción microsomal de cerebro de rata y utilizar un gradiente de sacarosa de tres peldaños Tamai et al (1974) separaron tres subfracciones, mientras que Kiang et al (1978), con un gradiente de sacarosa de cinco peldaños la resolvieron en cinco subfracciones. De las tres subfracciones obtenidas en el primer caso, las dos más abundantes corresponden a vesículas de RE liso y son casi análogas en su composición química y enzimática (Tamai et al 1974). De las cinco subfracciones separadas por Kiang et al (1978), la primera está constituida por vesículas grandes de membrana lisa; las restantes contienen membranas lisas, cisternas de Golgi y, en ocasiones, mitocondrias; además, se van enriqueciendo en membranas de retículo endoplasmático rugoso. De cualquier forma, las actividades de la ATPasa (Na - K), la NADPH-citocromo c reductasa y la acetilcolinesterasa varían, aunque con diferencias poco notables, entre una subfracción y otra (loc.cit.). En fin, las micrografías muestran una apariencia similar para las cuatro subfracciones que Neskovic et al (1973) obtienen

para la fracción microsomal de cerebro de rata joven, empleando un gradiente de cuatro escalones de sacarosa entre 1,15 y 2,0 M. Estas concentraciones de sacarosa difieren de las empleadas por Kiang et al (1978) para separar sus cuatro primeras subfracciones microsomales (0,5, 0,7, 0,9 y 1,1 M). En el presente trabajo, aunque los microsomas se separan en una sola banda mayoritaria, se observa la presencia de un halo de membranas microsomales hacia el fondo del tubo de ultracentrífuga; ello se ha puesto de manifiesto al determinar la actividad LDH a lo largo del tubo de ultracentrífuga (véase 5.4.2.1.1 y figuras 19 y 20).

Aunque la proporción de lípidos en los microsomas de cerebro es comparativamente superior a la exhibida por los de hígado, son las proteínas de las membranas microsomales de cerebro las que permiten que aquéllos se enfoquen al efectuar en enfoque isoeléctrico. El pI aparente para los microsomas de cerebro, está comprendido entre 5,02 y 5,18, concuerda con los valores obtenidos para la ATPasa en experimentos de electroenfoque de membranas de eritrocitos ($pI \cong 5$) y de xantina oxidasa ($pI \cong 5$) y de la 5'Nucleotidasa ($pI \cong 6$), en experimentos análogos realizados con la membrana de los glóbulos grasos de la secreción láctea (Allen y Humphries 1975). La aparición de una sola banda de pI aparente cercana a 5 con los microsomas de cerebro de rata (Figura 28) concuerdan, también, con los publicados por Fry y Bidges (1974) quienes separan la fracción microsomal por precipitación ácida a pH 5,5. Las propiedades eléctricas de los microsomas también se han puesto de manifiesto por Azzar et al (1981) en experimentos de isotacoforesis; en ellos, no se ha conseguido la separación de los microsomas en bandas nítidas, sino que se han eluído en once fracciones en las que se han analizado las diferencias respecto de las actividades enzimáticas.

En los experimentos de filtración en gel de Sepharose CL 4B, los microsomas de cerebro, aislados de medios que contenían o no DMSO, se han comportado como una fracción homogénea, ya que se eluyeron en un solo pico de proteína que coincidió con los picos de actividad LDH, MDH y 5'N. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tangen et al (1973) con hígado de rata, y por Capdevila et al (1975) con pulmón de rata. Ambos autores obtienen, por filtración en gel de Sepharose 2B, un solo pico correspondiente a los microsomas. Aunque Tangen et al (1973) han sugerido que la filtración en gel de Sepharose 2B permite la obtención de microsomas con una contaminación mínima por proteínas citosolubles, en los experimentos realizados en el presente trabajo se ha demostrado que ello no es del todo exacto. Enzimas citosolubles, como la LDH y la MDH se eluyen conjuntamente con los microsomas, además de hacerlo en un volumen de elución posterior, lo que prueba que una parte de las actividades LDH y MDH están unidas a las membranas microsomales. Este comportamiento se observa aunque la filtración se lleve a cabo en eluyentes de fuerza iónica que es suficiente (NaCl 0,15 M) para contrarrestar las posibles interacciones iónicas entre tales enzimas y las membranas microsomales.

Aunque en estos experimentos los microsomas se eluyeron en un pico único, la caracterización del mismo por microscopía electrónica mostró que la fracción no era morfológicamente homogénea. La explicación del fenómeno puede residir en que, aunque los microsomas eluyen en un solo pico, su distribución no es homogénea en toda la extensión del pico y eluyen primero los microsomas de mayor tamaño, mientras que los de menor tamaño eluyen coincidiendo con la cola del pico. No obstante, también es posible que los diversos componentes microsomales interaccionen entre sí. Esta última hipótesis puede

apoyarse en el hecho de que el volumen de elución de los microsomas tratados con desoxicolato (0,075 %) sea el mismo que el de los microsomas lavados con A. Las imágenes que muestran las micrografías correspondientes a los microsomas lavados con A (Figuras 38 - 40) y a los microsomas tratados con desoxicolato (Figura 46) son muy distintas y cabría esperar que el volumen de elución de ambas fracciones en experimentos de filtración en gel de Sepharose CL 4B, fuese distinto. En las micrografías obtenidas tras la separación de los microsomas de pulmón de rata por filtración en gel de Sepharose 2B (Capdevila et al 1975) se ha demostrado que la fracción es también heterogénea en cuanto a la opacidad de las vesículas y en cuanto a su tamaño.

Las micrografías de los microsomas de cerebro de rata, que se han aislado en el presente trabajo después de su tratamiento con desoxicolato (Figura 46), son distintas a las obtenidas por Weihing et al (1972) en hígado de rata; en ellas, el tratamiento con NaCl 0,14 M, con NaCl 1M o con carbonato-bicarbonato, no modifica el aspecto ni la integridad de las vesículas microsomales, mientras que el tratamiento con desoxicolato (0,075 %) rompe las vesículas pero sin que se desorganice su membrana. Las micrografías obtenidas en el presente trabajo para los residuos microsomales tratados con desoxicolato (0,075 %), se parecen más a las obtenidas después de tratar con lisofosfatidilcolina una subfracción microsomal de cerebro de rata (Katsuta et al 1978) o las vesículas sinápticas de cerebro de rata con tritón X-100 (0,1 %) (Soller et al 1973). En todos los casos, las micrografías demuestran una desorganización de las membranas. La diferencia de comportamiento de los detergentes en su actuación sobre los microsomas de hígado o de cerebro puede residir en la distinta proporción de lípidos existente en las membranas de ambas

fracciones.

Esta diferencia, unida a las diferencias de densidad de flotación y de composición, respecto de los enzimas marcadores de membrana, no permite establecer una analogía directa entre los componentes de ambos tipos de fracción microsomal, la aislada del tejido cerebral y la aislada del tejido hepático.

5.5

DISCUSION GENERAL

El presente trabajo constituye una contribución al conocimiento del catabolismo de las purinas en el tejido cerebral de rata.

Los parámetros cinéticos de los enzimas PNP y 5'N confirman el hecho de que, de todos sus posibles substratos fisiológicos, los mejores varían según el tejido y la especie; ello ya se discutió en el capítulo 5.1. Por otra parte, el que estos enzimas, como también la ADA y la GAH, no sean inhibidos por los intermediarios del metabolismo (Figura 4) distintos a sus propios productos de reacción parece indicar que estos enzimas están poco regulados. No obstante, ello no es así ya que, a nivel metabólico, se ha demostrado que la 5'N purificada está regulada por la concentración de nucleósidos di o trifosfato. Además, se ha demostrado que, a nivel genético, estos enzimas están muy regulados, como cabía esperar de enzimas relacionados indirectamente con el metabolismo de los ácidos nucleicos y de los nucleótidos en la célula.

La inducción o represión de los enzimas del catabolismo purínico , que se ha demostrado en microorganismos (Scazzochio y Darlington 1968) también se produce en organismos superiores. Así, las dosis elevadas de guanina producen el incremento de una de las formas de GAH de cerebro de rata cuya existencia postulan Kumar et al (1970 b). También las actividades 5'N, PNP y XDH , en hígado , se ven incrementadas por una dieta rica en proteína, mientras que lo mismo ocurre con la GAH como respuesta a la administración de la hormona del crecimiento (Panda et al 1962).

Además de los estudios cinéticos, es interesante comparar las velocidades de reacción de los enzimas purínicos entre sí. Los resultados, reseñados en el capítulo 5.1, demostraron que los enzimas que poseen una actividad específica mayor son la PNP y la GAH, aun cuando la reacción catalizada por la PNP es reversible. La 5'N y la ADA tienen velocidades de reacción comparativamente menores, aunque la 5'N con su substrato AMP es capaz de producir mayor cantidad de adenosina de la que puede desaminar la ADA. Sin embargo, es posible que estas hipótesis no sean del todo válidas en el sentido de que el catabolismo purínico investigado en la fracción soluble no guarde relación estricta con el que se desarrolla en el interior de la célula . El tipo de células del tejido cerebral es múltiple y la fracción soluble obtenida por homogeneización del tejido constituye un extracto de todas ellas. Así, la ADA, cuya actividad varía ampliamente de un tejido a otro (Adams y Harkness 1976), se encuentra en elevadas proporciones en las células de la glía (Dr. Marsall 1981,-Comunicación personal-) aunque no cabe descartar su presencia en las neuronas. Además de las diferencias de las actividades enzimáticas en los distintos tipos de células, es posible que la localización intracelular de los enzimas aquí estudiados varíe de un

tipo a otro de célula; en este trabajo se han podido demostrar ambas circunstancias.

Al comparar las actividades enzimáticas de cerebro y de cerebelo, se ha demostrado que la GAH se halla en muy escasa cantidad en el último. El significado fisiológico de este hecho, ya descrito anteriormente (Dawson 1971, Carpenne 1976), no está claro, pero se puede suponer que obedece al distinto comportamiento de ambos tejidos en su función nerviosa general que, para el cerebelo, se centra, casi exclusivamente, en la regulación de las actividades motoras (Baron et al 1978).

Por otra parte, la presencia de todos los enzimas purínicos, además de las deshidrogenasas LDH y MDH, es cualitativa y cuantitativamente distinta en los microsomas de cerebro de rata. Así, en los tratamientos de los microsomas con desoxicolato, se ha demostrado que la 5'N y la ADA se localizan en la parte externa de las membranas microsomales, a diferencia del resto de enzimas cuyas actividades, en los microsomas, sólo se ponen de manifiesto después del tratamiento con el detergente. La 5'N se encuentra en elevada cantidad en los microsomas con respecto al resto de los enzimas; el hecho puede hallarse en concordancia con el que la 5'N sea un enzima marcador de la membrana plasmática (Evans y Gurd 1973, Depierre y Karnovsky 1974 b, Brake et al 1978). No obstante, Stanley et al (1980) demostraron que existe una relación dinámica entre la 5'N localizada en la superficie celular y la 5'N intracelular, que también está unida a la membrana y se encuentra en la cara extracitoplasmática de las vesículas del interior de la célula. Los experimentos de "expresión" del tejido cerebral de rata, demostraron también que la ADA se comporta de modo diferente y se libera con más facilidad que el resto de los enzimas; ello se puede correlacionar con una distinta localización de la ADA que permita que se libere con mayor facilidad en tales experi-

mentos. Según Amberson y Bauer (1967, 1971), en los experimentos de separación de jugos por "expresión" se liberan enzimas localizados en el medio intersticial del tejido considerado. No obstante, es dudoso que todos los enzimas liberados provengan, exclusivamente, del medio intersticial en el que las proteínas libres se encuentran en muy pequeña cantidad.

Se ha demostrado, también, la distinta localización subcelular de los enzimas LDH, MDH, ADA, GAH, PNP y 5'N al analizar su presencia en la fracción de vesículas sinápticas de cerebro de rata. En ellas, las actividades de la 5'N y de la ADA son mucho mayores que las del resto de los enzimas si se comparan con las que se obtienen en la fracción microsomal de cerebro de rata.

En conjunto hay evidencias suficientes para correlacionar los comportamientos distintos de la ADA y de la 5'N con aspectos concretos de la función nerviosa en el cerebro. Ya en 1967 Scott, basándose en la distinta actividad de la 5'N en distintas regiones del encéfalo, emitió la hipótesis de que la 5'N debe actuar en procesos bioquímicos simples y en funciones neurofisiológicas. La 5'N y la ADA son los enzimas que descomponen el AMP y la adenosina que son, junto al ATP, considerados como posibles neurotransmisores y neuroreguladores por Burnstock (1972 a y b, 1975 b). Uno de los puntos en los que se apoya la hipótesis de Burnstock es en la presencia de 5'N y de ADA en los tejidos en los que se supone la presencia de nervios purinérgicos; no obstante, no se ha descrito hasta el presente la presencia de tales enzimas en las vesículas sinápticas en las que sólo se han puesto de manifiesto las actividades ATPasa (Na-K) y acetilcolinesterasa así como de la LDH (Tamir et al 1974, Morgan et al 1973). Aunque el ATP no sea considerado como neurotransmisor, se ha demostrado que se libera, junto a la acetilcolina de las sinapsis colinérgicas

puras (Silinsky 1975, Morel y Meunier 1981). Por otra parte, al someter a las neuronas corticales a estimulación eléctrica, se libera adenosina, que provoca una inhibición profunda de la excitabilidad de la corteza cerebral (Iversen et al 1971). También se ha demostrado que la adenosina produce, "in vivo", cambios de comportamiento de forma más eficaz que el AMP o el ATP, cuando se administra en el SNC (Yarbrough y McGuffin-Clineschmidt 1981). El ATP, el AMP o la adenosina se deben metabolizar y captar de nuevo por las células nerviosas (Burnstock 1972 a y b, 1981). El ATP se convierte a AMP por acción de la ATPasa que es un ectoenzima aunque también está presente en el interior de las células nerviosas (Burnstock 1972 a y b). El AMP, que no traspasa fácilmente las membranas, debe ser convertido en adenosina por la 5'N (Burnstock 1972 a y b) que es un ectoenzima, como se ha demostrado en cultivos de células cerebrales (Trams y Lauter 1975). La posible inactivación de la adenosina ha de ser efectuada por la ADA, enzima que se supone que está localizado en la superficie de las células cerebrales cultivadas. Ello no se ha podido demostrar en este trabajo, aunque sí se ha confirmado que la localización subcelular de la 5'N y la ADA en tales células es idéntica, por lo que la ADA puede estar localizada en la membrana plasmática junto a la 5'N (Trams y Lauter 1975). La analogía de comportamiento de la ADA y de la 5'N en los microsomas, observada en el presente trabajo, y su presencia en las vesículas sinápticas, parecen confirmar la hipótesis de que ambas intervengan en la inactivación del AMP y la adenosina.

Al considerar el aspecto estrictamente químico de la unión de los enzimas estudiados a los microsomas, tras el análisis de los experimentos del capítulo 5.2, se puede emitir una hipótesis netamente bioquímica acerca de tal unión. Un primer resultado importante es el que demuestra que, después de lavar

los microsomas con detergentes, varias veces, todavía conservan actividades de todos los enzimas estudiados. Además, al añadir los primeros productos del catabolismo purínico (AMP, GMP o IMP), éstos se transforman en los productos finales del metabolismo (véase 5.3.2.3), hipoxantina y xantina, lo que indica que tales enzimas están presentes en las membranas microsomales de forma activa y son capaces de desempeñar su función metabólica.

Como se requieren detergentes para la liberación paulatina de las actividades de los microsomas, previamente lavados con el medio de homogeneización, se puede suponer que la interacción entre los enzimas y las membranas sean, básicamente, de tipo hidrofóbico. De hecho, se demostró que el medio A es suficiente para anular las posibles interacciones iónicas. El NaCl que, en concentración de 4 M, favorece las interacciones no iónicas en experimentos de cromatografía de interacción hidrofóbica (Hjerteen 1976, Porath 1973), no libera, aquí, de las membranas microsomales las actividades enzimáticas en estudio, lo que apoya la hipótesis anterior. Cuando los microsomas se filtraron por un gel de Sepharose CL 4B equilibrado con B, el pico de MC eluidos coincide con los picos de actividad LDH, MDH y 5'N, por lo que la interacción entre estos enzimas y las membranas microsomales debe ser de tipo hidrofóbico.

El que se considere que la unión de los enzimas en estudio es de tipo hidrofóbico, no es óbice para admitir que en la homogeneización del tejido se liberen parcialmente, tal como muestra su identificación en la fracción soluble.

Por otra parte, las interacciones hidrofóbicas parecen variar de intensidad para los diferentes enzimas tal como pone de manifiesto el hecho de que mientras que la ADA se libera, en gran proporción, con desoxicolato al 0,075 %, es preciso

que la concentración de éste sea del 0,5 % para liberar entre un 70 y un 80 % de la actividad 5'N unida a las membranas. La ADA y los restantes enzimas que se comportan como ella en la fuerza de su interacción con las membranas microsomales (LDH, MDH, GAH y PNP), de acuerdo con lo propuesto por Singer (1972, 1974) (Tabla VI), se podrían considerar proteínas periféricas. A estas enzimas podría aplicárseles la denominación de "ambicuos" (Masters 1977, 1978 a y b), existiendo en dos formas en equilibrio, una unida a la membrana y otra no. En cambio, la 5'N se comporta como una proteína constituyente de membrana, según los mismos criterios propuestos por Singer (1972, 1974) (Tabla VI), ya que se requieren concentraciones elevadas del detergente para su liberación parcial.

Los enzimas cuya caracterización electroforética ha sido posible, muestran las mismas formas moleculares que aparecen en la fracción soluble y en los liberados de la fracción microsomal. La 5'N unida y la liberada de las membranas de los bastones de la retina tienen el mismo comportamiento cinético frente al AMP (Fukui y Shichi 1981). Lo mismo ocurre con el enzima unido y el solubilizado de las membranas de las células tumorales (Lelievre y Zachowski 1977). Por tanto, no cabe desechar la idea de que la homogeneización del tejido provoque la liberación de parte de los enzimas de membrana, dependiendo de la fuerza de sus interacciones, principalmente de las hidrofóbicas. Si ello es así, los datos comparativos de las actividades específicas para la ADA, GAH, PNP y 5'N, establecidas en la fracción soluble (Tabla X) no son del todo correctos. Así, por ejemplo, la presencia en los microsomas de una elevada proporción de 5'N, puede determinar que sea mayor la cantidad de adenosina formada a partir del AMP; esta adenosina que no es susceptible de transformarse totalmente en inosina por la ADA (véase 5.1.2), se recuperaría en mayor proporción a AMP por ac-

ción de la adenosina quinasa. En cualquier caso, la distinta localización subcelular de los enzimas, especialmente de la ADA y la 5'N (véase 5.3.2), sugiere la posibilidad de que parte de dichas actividades enzimáticas desempeñen, de una parte, funciones neurofisiológicas y, de otra, funciones bioquímicas del metabolismo purínico (Scott 1967). En tal caso, es muy probable que ambas funciones estén interconectadas en la célula.

Quizás, la obtención de resultados "in vitro" más parecidos a los que se producen "in vivo" se pueda conseguir por medio del uso de microsomas. Los experimentos de homogeneización del tejido cerebral con extractos hepáticos ricos en XDH, han demostrado que las vesículas que se aislan en la fracción microsomal no incorporan XDH a su interior; es posible, por tanto, que parte de los microsomas consten de locus celulares intactos que se forman durante la homogeneización. Para comprobar esto se debería idear un método para el estudio cinético de los enzimas del metabolismo purínico por medio del uso de microsomas. En principio, esta tarea, difícil debido a la poca proporción en la que se encuentran los enzimas del catabolismo purínico si se comparan con la LDH y la MDH, tan abundantes en el interior de la célula. No obstante, los primeros intentos se podrían abordar mediante la técnica de permeabilización de las membranas celulares por empleo de reactivos bifuncionales (Lazo y Sols 1979). Es posible que esta técnica diera mejores resultados que la usada por Tritsch (1974) y Tritsch et al (1976) que consiste en el empleo de mezclas de disolventes orgánicos para el estudio del comportamiento de la ADA en tales medios cuya constante dieléctrica es más semejante a la que existe en las proximidades de las membranas de la célula.

En el presente trabajo se ha pensado en la posibilidad de obtener una mayor cantidad de microsomas y, paralelamente, una mayor cantidad de actividades enzimáticas ligadas con objeto de poder abordar estudios posteriores del metabolismo purínico en los microsomas.

La obtención de mayor cantidad de microsomas por g de tejido cerebral ha sido posible mediante el uso del dimetilsulfóxido en los medios de homogeneización. Ambos tipos de microsomas, separados en ausencia o en presencia de DMSO, mostraron un comportamiento similar en cuanto a la liberación de los enzimas LDH, MDH, ADA, GAH, PNP y 5'N. La comparación de ambos tipos de microsomas también se llevó a cabo determinando su contenido en enzimas marcadores de orgánulos subcelulares. Los estudios que se han realizado al respecto, han demostrado que los dos tipos de microsomas son, básicamente, análogos; en ellos, la presencia de catalasa es prácticamente nula y la de LDH, MDH, GDH, NADPH-citocromo c reductasa, FA, tiamin pirofosfatasa y glucosa - 6 - fosfatasa es análoga. Así, en los microsomas aislados en ausencia o en presencia de DMSO no aparecen peroxisomas, mientras que la contaminación por mitocondrias, lisosomas y aparato de Golgi es análoga. Es de destacar que enzimas que, en tejido hepático, se consideran marcadores de microsomas (Gallardo 1979), la glucosa - 6 - fosfatasa y la tiamin pirofosfatasa, aparecen en muy pequeña cantidad en los microsomas de cerebro. Se ha demostrado, en cambio, que la NADPH-citocromo c reductasa es un enzima marcador de microsomas de cerebro al igual que lo es en hígado (Weihsing et al 1972, Kiang et al 1978).

Los microsomas de cerebro, obtenidos en ausencia o en presencia de DMSO, también se han caracterizado por microscopía electrónica. No obstante, esta técnica no puede dar resulta-

dos tan completos como la caracterización bioquímica. En las micrografías de los microsomas, además de vesículas claras, similares a las lisas de hígado, se observa la presencia de vesículas opacas. Como tales vesículas no pueden corresponder a peroxisomas, se postula que puedan ser vesículas sinápticas liberadas de ciertos tipos de terminales nerviosos, entre los que se encuentran los purinérgicos (Burnstock 1981). Tampoco se puede descartar que las vesículas opacas, principalmente las de mayor tamaño, correspondan a lisosomas presentes en el tejido cerebral (Palade 1959, Essner 1962, Rhodin 1963, Freeman 1964, Hofer 1968). En la fracción microsomal de cerebro de buey se ha demostrado la presencia de membranas y de vesículas sinápticas (Kakiuchi et al 1981). Por su parte, la presencia de vesículas semiopacas, algunas con apariencia de mitocondrias, en las micrografías de los microsomas (DMSO) podría corresponder a una alteración de las vesículas claras que se observan en las micrografías de los MC (sin DMSO), por acción del DMSO.

Un último objetivo del presente trabajo consistió en intentar el subfraccionamiento de la fracción microsomal a fin de encontrar una o varias subfracciones cuyo contenido de enzimas del catabolismo purínico fuese diferente.

Efectuando experimentos de ultracentrifugación isopícnica en Percoll, filtración en gel de Sepharose CL 4B y de enfoque isoeléctrico preparativo, no se ha conseguido obtener subfracciones microsomales. Los microsomas separados en ausencia o en presencia de DMSO, se comportaron, en tales experimentos, como una fracción homogénea, aunque las micrografías electrónicas de los microsomas demostraron su heterogeneidad en cuanto a tamaño y densidad electrónica de sus vesículas. No obstante, el mismo resultado se obtiene y se repite con las

tres técnicas de separación empleadas. En experimentos realizados por Blume (1979) en hígado de rata, los microsomas se obtienen en una sola fracción en un gradiente de densidad de Percoll. En experimentos de filtración en gel de Sepharose 2B, los microsomas de hígado (Tangen et al 1973) y de pulmón (Capdevila et al 1975) de rata se han obtenido en una única fracción. Además, las micrografías del pico de elución de los microsomas de pulmón (loc.cit.) muestran que aquellos tampoco son homogéneos en cuanto al aspecto y al tamaño de las vesículas.

En experimentos realizados con gradientes discontinuos de sacarosa, los microsomas de cerebro de rata se han separado en tantas fracciones como número de escalones poseía el gradiente. El dicho gradiente, el margen de concentraciones de sacarosa no es muy amplio (Neskovic et al 1973, Tamai et al 1974, Kiang et al 1978), extremo éste que ya se ha discutido anteriormente (véase 5.4.3). Así, es de suponer que en gradientes continuos, la mayor cantidad de microsomas se obtenga en una única fracción. De hecho, en los experimentos de densidad de flotación en Percoll que se han realizado en este trabajo, aparte de la fracción mayoritaria de microsomas, se obtuvo un halo que también correspondía a fracciones membranosas, calificadas así por su contenido en actividad LDH (véase 5.4.2.1.1, figuras 19 y 20).

De cualquier manera, sería conveniente perseverar en los intentos de subfraccionamiento de los microsomas tratando de establecer si las actividades del catabolismo purínico corresponden a una subfracción o a un orgánulo subcelular concreto. Si ello no fuese así, otro medio adecuado de asignar dichas actividades a orgánulos subcelulares concretos, sería el uso de antígenos específicos de los enzimas considerados en las téc-

nicas de inmunocitoquímica aplicadas a la microscopía electrónica. Esta tarea, que no es sencilla, podría dar los resultados apetecidos y confirmar que los microsomas son un buen medio para el estudio del metabolismo purínico y quizás también de otros metabolismos no exclusivamente ligados al transporte electrónico o a proteínas constituyentes de membrana.

6

CONCLUSIONES

1) Al comparar algunos enzimas (ADA, GAH, PNP y 5'N) que intervienen en el catabolismo de las purinas en el tejido cerebral de rata se puede afirmar que:

- La afinidad de la 5'N por sus substratos decrece desde al AMP, al IMP, GMP y XMP
- La velocidad máxima de reacción de la PNP con inosina es la mayor, pero el coeficiente de eficacia es más elevado con guanosina
- Los valores de las velocidades máximas indican que la PNP es la más activa, con guanosina o inosina, seguida de la GAH con guanina; muestran, además, que la ADA transforma, en parte en inosina a la adenosina procedente del AMP
- La escasa actividad de la 5'N con XMP y de la PNP con xantosina, sugieren que ambos metabolitos no se degradan apreciablemente "in vivo"
- La ADA, GAH, PNP y 5'N, se inhiben competitivamente por sus propios productos de reacción, pero su actividad no se modifica por otros intermediarios del metabolismo de las purinas .

2) La fracción microsomal de cerebro de rata, lavada con disoluciones de fuerza iónica moderada, libera por sonicación o mediante desoxicolato (éste con mayor eficacia) actividades LDH, MDH, ADA, GAH y PNP. Se hallan éstas en análoga proporción y exhiben la misma composición electroforética que las de la fracción soluble del tejido.

La suspensión del residuo de microsomas lavado, extraído repetidamente con desoxicolato exhibe, todavía, las actividades enzimáticas enumeradas.

3) Las vesículas de la fracción microsomal de tejido cerebral de rata no incorporan la XDH de hígado de pollo presente en el medio de homogeneización y las actividades enzimáticas liberadas no se modifican con el contenido proteico del medio.

Los hechos sugieren que parte de las vesículas ya se hallan presentes en el tejido o que, al formarse durante el proceso de homogeneización, no ocluyen cantidades significativas del medio en el que se efectúa el homogeneizado.

4) Las actividades ADA y 5'N de la suspensión de microsomas, que ha sido tratada con desoxicolato al 0,075 % no varían sensiblemente, pero las actividades LDH, MDH, GAH y PNP experimentan un incremento notable. Se sugiere que la ADA y la 5'N se hallan localizadas en la cara exterior de las membranas de los componentes de la fracción microsomal, mientras que los restantes enzimas se hallan ocluidos en ellos. La ADA es el enzima que se libera más fácilmente en los jugos obtenidos por "expresión" del tejido cerebral de rata; le siguen la 5'N, la PNP, la LDH, la MDH y la GAH.

5) Al incubar la suspensión de microsomas de tejido cerebral de rata con AMP, GMP o IMP, se produce hipoxantina o xantina, productos finales del catabolismo de las purinas en dicho tejido; se pone así de manifiesto que las vesículas contienen 5'N, ADA, GAH y PNP.

6) La actividad 5'N en los microsomas del tejido cerebral de rata es comparativamente superior a la del resto de los enzimas considerados y todavía es perceptible en la suspensión de microsomas extraída repetidamente, con desoxicolato o con tritón X-100. El EDTA inhibe la actividad 5'N de la suspensión, pero aquélla se recupera al lavar las vesículas.

7) Las fracciones soluble y microsómica de cerebelo de rata también poseen actividades LDH, MDH, ADA, GAH, PNP y 5'N. La actividad GAH de ambas fracciones es inferior a la que exhiben las correspondientes fracciones del tejido cerebral. Las actividades ADA y 5'N de las vesículas sinápticas de cerebro de rata son superiores a las del resto de los enzimas estudiados. El hecho puede correlacionarse con la posibilidad de degradación del AMP y de la adenosina y su papel como neurotransmisores en los nervios purinérgicos.

8) Al separar la fracción microsomal del tejido cerebral de rata, la cantidad de microsomas separada aumenta con la concentración del homogeneizado inicial y es independiente de la constante dieléctrica del medio. Sin embargo, si el medio de homogeneización contiene cantidades crecientes de DMSO aumentan correlativamente el rendimiento de la separación y las actividades LDH, MDH, ADA, GAH, PNP y 5'N que se liberan de los microsomas. De cualquiera de los medios de homogeneización anteriores se separan microsomas que exhiben, cualitativa y cuantitativamente, las mismas actividades enzimáticas respecto de los enzimas marcadores de orgánulos subcelulares.

9) Las fracciones microsomales separadas de medios que contenían o no DMSO cuando se someten a ultracentrifugación isopícnica en Percoll, se resuelven en una banda única cuya densidad está comprendida entre 1,020 y 1,040 g/ml. Al efectuar experimentos análogos con el sobrenadante post-mitocondrial se observa que los microsomas se resuelven, también, en una sola banda cuya densidad oscila entre los márgenes indicados. Los hechos comentados sugieren que los lavados sucesivos de los microsomas con el medio de homogeneización y las operacio-

nes de ultracentrifugación no modifican apreciablemente la densidad de la fracción microsomal.

Así mismo, la filtración en gel de Sepharose CL 4B, de los microsomas obtenidos en medios con o sin DMSO, conduce a un solo pico, cuyo volumen de elución fue cercano al del azul de dextrano. El volumen de elución de los microsomas previamente lavados, no varió con respecto al correspondiente a los MC no tratados.

El enfoque isoeléctrico preparativo en columna, de los microsomas separados en medios con DMSO proporciona una sola fracción de pI comprendido entre 5,02 y 5.18.

10) Las micrografías electrónicas de los microsomas separados de medios sin DMSO muestran la presencia predominante de vesículas claras y opacas; la cantidad de estas últimas llega a ser mayor si el medio contiene DMSO. El lavado de las vesículas con los medios de homogeneización o la sonicación, no modifican su aspecto, pero el desoxicolato provoca su desorganización y ya no se perciben por el método indicado.

(11) La fracción microsomal del tejido cerebral de rata, separada de diferentes medios de homogeneización, exhibe homogeneidad de comportamiento, como demuestran diversos experimentos comparativos, proponiéndose, por ello, el empleo de la fracción separada en presencia de DMSO por su rendimiento más favorable. La fracción mencionada permite estudiar la transformación de los nucleótidos y de los nucleósidos purínicos y de las purinas en hipoxantina y xantina y contribuir, así, a confirmar la hipótesis del nervio purinérgico formulada por Burnstock (1972 a y b).

B I B L I O G R A F I A

- ABDULLAH Y.H. y K. HAMADAH (1970). *Lancet* 1, 378-381.
- ABDULLAH Y.H. y E. McFARLANE (1972). *Biochem. Pharmacol.* 21, 2841-2847.
- ACKERET C., H.J. PLUSS y W.H. HITZIG (1976). *Pediat. Res.* 10, 67-70.
- ADAMS A., y R.A. HARKNESS (1976). *Clin. Exp. Immunol.* 26 647-649.
- ADAMS D.H. y L. LIM (1966). *Biochem. J.* 99, 261-265.
- ADAMS A., A.D. NIKOL, J.M. ANDERSON y R.A. HARKNESS (1971). *Biochem. J.* 125, 36p.
- AEBI H. (1974). En "Methods of enzymatic analysis" vol.2, pg. 672-684. Academic Press . New York.
- AGARWAL R.P., y R.E. PARKS Jr. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 644-647.
- AGARWAL R.P. y R.E. PARKS Jr. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 3763-3768.
- AGARWAL K.C., R.P. AGARWAL, J.D. STOECKLER y R.E. PARKS Jr. (1975). *J. Biochemistry* 14, 79-84.
- AGARWAL R.P., S.M. SAGAR y R.E. PARKS Jr. (1975 a). *Biochem. Pharmacol.* 24, 693-701.
- AGARWAL R.P., S. CHA (primer autor) y R.E. PARKS (1975 b) *Biochem. Pharmacol.* 24, 2187-2197.
- AGARWAL R.P., O.W. GABTREE, R.E. PARKS, J.A. NELSON, R. KEIGHTLEY, R. PARKMAN, F.S. ROSEN, R.C. STERN y S.H. POLMAR (1976). *J. Clin. Invest.* 57, 1026-1035.
- AGARWAL R.P., T. SPECTOR y R.E. PARKS (1977). *Biochem. Pharmacol.* 26, 359-367.
- AHLERS J., T. GUNTER y H.W. PETER (1978). *Int. J. Biochem.* 9, 573-578.
- AIKAWA T. (1959). Science Report of Topokn. University 25, 73-80.
- AIKAWA T. (1966). *Comp. Biochem. Physiol.* 17, 271-284.
- AIKAWA Y. y T. AIKAWA (1981). *Comp. Biochem. Physiol.* 70 B 199-208.

- AIKAWA T., Y. UMEMORI-AIKAWA y J.R. FISCHER (1977). *Comp. Biochem. Physiol.* 58, 357-364.
- AKERLOFF G. (1932). *J. Am. Chem. Soc.* 54, 4125-4139.
- ALBRECHT R., M.A. PELISSIER, P. MANCHON y J.P. ROSPARS (1974) *C.R. Soc. Biol.* 167, 1552-1557.
- ALI S., A. SITARAMAYA y K.S. KUMAR (1974). *Biochem. J.* 137, 85-92.
- ALLEN J.C. y C. HUMPHRIES (1975). En "Isoelectric Focusing" J.P. Arbuthnott y J.A. Beeley eds. pg.347-353. Butterworths.
- AMBACHE N. (1978). *Proc. Symp. Vasc. Neuroeff. Mech.* 1978 Publicado en 1980. pg. 183-184.
- AMBACHE N., S. DALY, S.W. KILLIC y J.P. WOODLEY (1977). *British J. Pharmacol.* 61, 113p-114p.
- AMBACHE N., S.W. KILLIC, J.P. WOODLEY (1977). *British J. Pharmacol.* 61, 464p.
- AMBERSON W.R. y A.C. BAUER (1967). *J. Cell.Physiol.* 70, 91-104.
- AMBERSON W.R., y A.C. BAUER (1971). *J. Cell. Physiol.* 77, 281-300.
- AMBERSON W.R., A.C. BAUER. D.E. PHILPOTT y F. ROISEN (1964) *J. Cell. and Comp. Physiol.* 63, 7-24.
- ANDREWS T.M. y J.R. TATA (1968). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 1050-1056.
- ANDREWS T.M. y J.R. TATA (1971). *Biochem. J.* 121, 683-694.
- ARCH J.R.S. y E.A. NEWSHOLME (1978). *Biochem.J.* 174, 965-977.
- ARIAS I.M., D. DOYLE y R.T. SCHIMKE (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 3303-3315.
- ARNOLD H. y D. PETTE (1968). *Eur. J. Biochem.* 6, 163-171.
- ASANO T. y S. SPECTOR (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 977-981.
- AUDY J.P., P. BASTIDE y G. DASTUGUE (1969). *Path. Biol.* 17, 975-977.
- AZZAR G., A. DEGIULI. J.P. BENEDETTO y R. GOT (1981) *J. Chromatography* 213, 177-182.
- BABSKII E.B. y I. MALKINAN (1950). *C.R. Acad. Sci. USSR* 74 1135-1137.

- BADER M-F., J. CIESIELSKI-TERESKA, D. THIERSE, J.E. HESKETH y D. AUNIS (1981). *J. Neurochem.* 37, 917-933.
- BAGINSKI E.S., P.P. FOA y B. ZAK (1974). En "Methods of Enzymatic analysis" vol. 2, pg. 876-880. H.U. Bergmeyer ed. 2ª edición inglesa. Academic Press. New York.
- BAGANARA A.S., A.A. LETTER y J.F. HENDERSON (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 374, 259-270.
- BARKER G.R. y I.C. GILLAM (1960). *Biochim. Biophys. Acta* 40, 163-164.
- BARON R., D. BIRNE y B. KANTOWITZ (1980). En "Psicología : Comprensión de la conducta" pg. 37-76. Edit. Interamericana.
- BEACHAN I.R. y R.M. PRITCHARD (1971). *Mol. Gen. Genetics* 110, 289-298.
- BENDICH A. (1955). En "The nucleic acids" vol. 1, pg. 95 Academic Press. New York.
- BENEDETTO J.P., M.B. MARTEL y R. GOT (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 587, 1-11.
- BENKE P.J. y D. DITTMAR (1976). *Pediat. Res.* 10, 642-646.
- BERGMAYER H.U., K. GAWEHN y M. GRASSL (1974). En "Methods of enzymatic analysis" vol. 1, pg. 495-496. Academic Press. New York.
- BERGSTROM J.P. y A.L. BIEBER (1978). *Prep. Biochem.* 8, 275-293.
- BERKES-TOMASEVIC y H. HOLZER (1967). *Eur. J. Biochem.* 2, 98-101.
- BERNE R.M. (1963). *Am. J. Physiol.* 204, 317-322.
- BERNE R.M., R. RUBIO y R.R. CURNISH (1974). *Circ. Res.* 35, 262-271.
- BLOBEL G. y Van R. POTTER (1966). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 50, 1283-1288.
- BLOEMENDAL H., W.S. BONT y E.L. BENEDETTI (1964). *Biochim. Biophys. Acta* 87, 177-180.
- BLOEMENDAL H., W.S. BONT, M. De VRIES y E.L. BENEDETTI (1967) *Biochem. J.* 103, 177-182.
- BLUME H. (1979). *Arch. Pharmazie (Weinheim)* 312, 561-572.
- BODANSKI O., M.K. SCHWARTZ (1963). *J. Biol. Chem.* 238, 3420-3427.

BONT W.S., G. REZELMAN G. y H. BLOEMENDAL (1965). *Biochem. J.* 95, 15c-17c.

BOSSMAN H.B. y G.Z. PIKE (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 227, 402-412.

BOUCHILLOUX S., O. CHABAUD y C. RONIN (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 322, 401-420.

BRADY T.G. y W. O'CONNELL (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 62, 216-229.

BRAKE E.T., P.C. WILL y J.S. COOK (1978). *Membrane Biochemistry* 2, 17-45.

BRDICZKA D., W. KREBS y P. KLOOCK (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 297, 203-212.

BROWN B.L., J.G. SALWAY, D.M. ALBANO, R.P. HULLIN y R.P. EKINS (1972). *British J. Psychiatry* 120, 405-408.

BROWN G.B., P.M. ROLL, A.A. PLENT y L.F. CAVALIERI (1948) *J. Biol. Chem.* 172, 469-484.

BRUGUERA P. (1982). Tesis Doctoral. Barcelona.

BÜC H.A., J.C. KAPLAN y A. NAJMAN (1979). *Clin. Chim. Acta* 95, 83-88.

BURGER R.M. y J.M. LOWENSTEIN (1970). *J. Biol. Chem.* 245, 6274-6280.

BURGER R.M. y J.M. LOWENSTEIN (1975). *Biochemistry* 14, 2362-2366.

BURNSTOCK G. (1972 a). *British J. Pharmacol.* 44, 451-461.

BURNSTOCK G. (1972 b). *Pharmacol. Rev.* 24, 509-581.

BURNSTOCK G. (1975 a). En "Handbook of Psychopharmacology" vol. 5, pg. 131-194. L.L. Iverson y S.H. Snyder eds.

BURNSTOCK G. (1975 b). En "Neuroregulators and Hypothesis of Psychiatric disorders" pg. 470-477. E. Usdin, D. Hamborg y J.D. Barchas eds. Oxford Univ. Press. London.

BURNSTOCK G. (1976). *J. Theor. Biol.* 62, 491-503.

BURNSTOCK G. (1980). *Progress in Biochem. Pharmacol.* 16, 141-154.

BURNSTOCK G. (1981 a). *J. Physiol.* 313, 1-35.

BURNSTOCK G. (1981 b). *Scandinavian J. Gastroenterology* 16, 1-9.

- BURNSTOCK G. y M. COSTA (1973). *Gastroenterology* 64, 141-144
- BURRIDGE P.W., V. PAETKAN V. y J.F. HENDERSON (1977). *J. Immunology* 119, 675-678.
- BUSQUETS M., J. BARO, A. CORTES y J. BOZAL (1979). *Int. J. Biochem.* 10, 823-835.
- CAMPBELL P.N. (1970). *FEBS Letters* 7, 1-7.
- CAMPBELL P.N., H.R. MAHLER, W.J. MOORE y S. TEWARI (1966). *Biochemistry* 5, 1174-1184.
- CAPDEVILA J., S.W. JACOBSSON, B. JERNSTROM, O. HELIA y S. ORRENIUS (1975). *Cancer Res.* 35, 2820-2829.
- CARPENE, FALASCA, HAKIM, SOLAINI (1976). *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* 52, 497-502.
- CARSON D.A. y SEEGMILLER J.E. (1976). *J. Clin. Invest.* 57, 274-282.
- CARSON D., R. GOLDBLUM y J.E. SEEGMILLER (1977). *J. Immunol.* 18, 270-273.
- CARTIER P. y M. HAMET (1976). *Clin. Chim. Acta* 71, 429-437.
- CARRAWAY W.T. (1966). *Clin. Chem.* 12, 187-193.
- CARRAWAY K.L., D.D. FOGLE, R.W. CHESNUT, J.M. HUGGINS y C.A. CAROTHERS-CARRAWAY (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 6173-6178.
- CASTELLINO F.J. y R. BARKER (1968). *Biochemistry* 7, 2207-2217.
- CATSIMPOOLAS N. (1975). En "Isoelectric focusing" pg. 58-73. J.P. Arbuthnott y J.A. Beeley eds. Butterworths.
- CLELAND W.N. (1963). *Biochim. Biophys. Acta* 67, 173-187.
- COHEN A. y D.W. MARTIN (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 4428-4430
- COHEN A., A.D. DOYLE, D.W. MARTIN Jr. y A.J. AMMAN (1976). *N. Eng. J. Med.* 295, 1449.
- COLEMAN R.A. (1973 a). *British J. Pharmacol.* 48, 360-361.
- COLEMAN R. A. (1973 b). *British J. Pharmacol.* 57, 51-57.
- COMTE J. y D.C. GAUTHERON (1978). *Biochimie* 60, 1299-1305.
- COOPER T.G. (1977). En "The tools of Biochemistry" pg. 204-206. John Wiley & Sons eds. Wiley Interscience. New York.
- CORNFORD E.M., W.N. OLENDORF (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 394, 211-219.

- CORNISH-BOWDEN A. (1976). En "Principles of enzyme kinetics" Butterworths & Co. London.
- CUATRECASAS P. y C.B. ANFONSEN (1971). *Ann. Rev. Biochem.* 40, 259-278.
- CURRIE R. y C. BRAY (1967). *Biochem. J.* 104, 634-638.
- CHAMPANERIA S. y R.J.T. PENNINGTON (1981). *IRCS Medical Science Cell and Membrane Biology* 9, 1051-1051.
- CHANG T. y A.J. GLAZKO (1976). *Res. Com. Chem. Path. and Pharmacol.* 14, 127-139.
- CHAO H.M. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 2330-2333.
- CHASSY B.M. y R.J. SUHADOLNIK (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 3655-3658.
- CHATTERJEE S.K., M. BHATTACHARYA y J.J. BARLOW (1979). *Anal. Biochem.* 95, 497-506.
- DADDONA P.E. y W.N. KELLEY (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 110-115.
- DALLNER G. (1963). *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.* 166
- DALLNER G. y R. NILSSON (1966). *J. Cell. Biol.* 31, 181-193.
- DAVID N.A. (1972). *Ann. Rev. Pharmacol.* 12, 353-374.
- DAVIES M.T. (1959). *Analyst* 84, 248-251.
- DAVIS B.J. (1964). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- DAWSON D. (1971). *Neurology* 21, 621-626.
- De DUVE C. (1959). En "Subcellular particles" pg. 128-159. T. Hayashi ed. Ronald Press Company. New York.
- De DUVE C. (1964). *J. Theor. Biol.* 6, 33-59.
- DEAS J.E., L.T. LEE y C. HOWE (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 296-304.
- DEPIERRE J.W. y M.L. KARNOWSKY (1974 a). *J. Biol. Chem.* 249, 7111-7120.
- DEPIERRE J.W. y M.L. KARNOWSKY (1974 b). *J. Biol. Chem.* 249, 7121-7129.
- DINESCU-ROMALO G., C. MIMAI y L. VLAD (1977). *Rev. Roum. Biochim.* 14, 161-165.
- DODD G.H. (1973). *Eur. J. Biochem.* 33, 418-427.

- DORN M., J.R.ANDREESEN y G. GOTTSCHALK (1978). Arch. Microbiol. 119, 7-11.
- DORNAND J., C. REMIANIC y J.C. MANI (1977). Biochimie 59, 425-432.
- DORNAND J., J.C. BONNAFOUS y J.C. MANI (1978) Eur. J. Biochem. 87, 459-465.
- DORNAND J., J.C. BONNAFOUS, C. GAVACH y J.C. MANI (1979). Biochimie 61, 973-977.
- DOSS R.C., C.A. CAROTHERS-CARRAWAY y K.L. KARRAWAY (1979). Biochim. Biophys. Acta 570, 96-106.
- DOWD D.J., D.C. QUINLAN y J. HOCHSTADT (1977). Biochemistry 16, 4526-2532.
- DRURY A.N. y A. SZENT-GYORGY (1929). J. Physiol. 68, 213-217
- DVORAK H.F. y L.A. HEPPEL (1968). J. Biol. Chem. 243, 2647-2653.
- ECOBICHON D.J. (1976) Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 14, 515-525.
- EDWARDS N.L., E.W. GELFAND, D. BIGGAR e I.H. FOX (1978 a). J. Lab. Clin. Med. 91, 736-749.
- EDWARDS N.L., D.B. MAGILAVY, J.T. CASSIDY e I.H. FOX (1978 b). Science 201, 628-630.
- ELDUQUE A. (1979). Tesis Doctoral. Barcelona.
- ELDUQUE A., F. CASADO, A. CORTES y J. BOZAL (1982). Int. J. Biochem. 14, 221-229.
- ENGELBRESCHT H.L. y H.L. SADOFF (1969). J. Biol. Chem. 244, 6228-6232.
- EVANS W.H. y J.W. GURD (1973). Biochem. J. 133, 189-199.
- FELGNER P.L., y J.H. WILSON (1977). Arch. Biochem. Biophys. 182, 282-294.
- FERNANDES J.F. y O. CASTELLANI (1958). Exp. Parasitol. 7, 224-235.
- FERNANDEZ-SANTOS T. (1978). Tesis Doctoral. Barcelona.
- FISKE C.H. y Y. SUBBAROW (1925). J. Biol. Chem. 66, 375-400
- FLEIT H., M. CONKLYN, R.D. STEBBINS y R. SILBER (1975). J. Biol. Chem. 250, 8889-8892.

- FONOLL C. (1981). Tesis Doctoral. Barcelona.
- FONOLL C., E.I. CANELA y J. BOZAL (1982). *Int. J. Biochem.* 14, 679-683.
- FORMEISTER J.F., y G.L. TRITSCH (1976). *Surgery* 79, 111-117
- FOX I.H. y P.J. MARCHANT (1974). *Canad. J. Biochem.* 52, 1162-1166.
- FOX I.H. y P.J. MARCHANT (1976). *Canad. J. Biochem.* 54, 1055-1060.
- FREEMAN J.A. (1964). En "Cellular Fine Structure" pgs. 42-43, 50-51, 70-71 y 75-76. McGraw-Hill.
- FRICK P. y J.M. LOWENSTEIN (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 6372-6378.
- FRIEDKIN M. (1952). *Am. Chem. Soc.* 74, 112-115.
- FRIEDKIN M. y H.M. KALCKAR (1950). *J. Biol. Chem.* 184, 437-448.
- FRIEDKIN M. y KALCKAR (1961). En "The enzymes". vol. 5, pg. 237-251. 5ª edición. Academic Press. New York.
- FRITZSON P. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 151, 716-718.
- FRITZSON P. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 178, 534-541.
- FRITZSON P. (1978). *Advances in Enzymes Regulation* 16, 43-61
- FRY J.R. y J.W. BIDGES (1974). *Biochem. Soc. Trans.* 2, 600-602.
- FUKUI H. y H. SHICHI (1981). *Archives Biochem. Biophys.* 212, 78-87.
- GADJUS A. (1978). *La nouvelle presse medicale* 7, 929-934.
- GALANTI, RUSSO, NARDIELLO y GIUSTI (1975). *Enzyme* 20, 90-97
- GALILEA J. (1981). Tesis Doctoral . Barcelona.
- GALILEA J., E.I. CANELA y J. BOZAL (1981). *Int. J. Biochem.* 13, 773-776.
- GALINDO A., K. KRNJEVIC y S. SCHWARTZ (1967). *J. Physiol. (London)* 192, 359-377.
- GALLARDO J. (1979). Tesina. Universidad de Barcelona.
- GARDNER R. y A. KORNBERG (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 2383-2388.
- GERBAUT L., E. REY y G. OLIVE (1976). *Clin. Chem.* 22, 939-940

- GILPIN R.W. y H.L. SADOFF (1971). 246, 1475-1480.
- GIUSTI G. (1974). En "Methods of enzymatic analysis" vol. 2, pg 1092. H.U. Bergmeyer ed. 2ª ed. Academic Press. New York.
- GLANTZ M.D. y A.S. LEWIS (1978). En "Methods in enzymology" vol. LI. pg. 524-530. 3ª ed. Academic Press. New York.
- GOÑI F.M., J.C. GOMEZ, M.A. VENTURA y E. SANTIAGO (1977). Rev. Esp. Fisiol. 33, 337-340.
- GOT K., G.M. POLYA, J.B. POLYA y L.M. COCKERILL (1967). Biochim. Biophys. Acta 135, 225-235.
- GRUNWALD J., T. MING y G. SWICHAN (1978). Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 565-570.
- GUTTERIDGE W.E. y M.J. DAVIES (1981). FEBS Letters 127, 211-214.
- HAGLUND H. (1975). En "Isoelectric focusing" pg 3-22. J.P. Arbuthnott y J.A. Beeley eds. Butterworths.
- HALCAK , PECHAN, y ERGEB (1974). Exp. Med. 17, 65-73.
- HAMILL S. y G.L. TRITSCH (1976). J. Medicine 7, 227-237.
- HANSEN O. (1972). British J. Psychiatry 121, 341-350.
- HANSEN O. y M.D. KOUDI (1974). British J. Psychiatry 125, 268-274.
- HARDONK M.J., T.J. MESKENDORP-HAARSMA y J. KOUDSTAAL (1978). Histochemistry 58, 177-181.
- HARLEY E.H., A. HEATON y W. WICOMB (1978). 27, 1743-1754.
- HARTMANN K.H. (1972). J. Neurochem. 19, 1409-1411.
- HSUNUMA K. y T. ISHIKAWA (1977). Biochim. Biophys. Acta 480, 178-193.
- HATEFI Y. y W.G. HANSTEIN (1969). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1129-1136.
- HELLER H. y H. McILWAIN (1973). Brain Res. 53, 105-116.
- HEMMINKI K. y O. SUOVANIEMI (1973). Biochim. Biophys. Acta 298, 75-83.
- HENDERSON J.F. y A.R.P. PATERSON (1973). En "Nucleotide metabolism. An introduction". pg. 95-170. Academic Press. New York.
- HENDERSON J.F., A.S. BAGNARA, G.W. GRANTREE y C.A. LOMAX (1975 a). Adv. Enzyme Regul. 13, 37-64.

- HENDERSON J.F., I.W. BROX, J.H. FRASER y C.A. LOMAX (1975 b) En "Pharmacologic Basis of cancer chemotherapy" pg. 663-680. Williams & Wilkins. Baltimore.
- HENDERSON J.F., J.K. LOWE, y J. BARANKIEWICZ (1977). En "Purine and pyrimidine metabolism. CIBA foundation" Symposium 48 (new series) pg. 3-21.
- HENNACE D.M., y L.A. HORROCKS (1978). Bull. Molec. Biol. and Medicine vol. 3, 207-221.
- HERSCHO A., A. RAZIN, T. SHOSHANI y J. MAGER (1967). Biochim. Biophys. Acta 149, 59-73.
- HERSFIELD M.S. y N.M. KREDICH (1978). Science 202, 757-760.
- HERSFIELD M.S., F.F. SNYDER y J.E. SEEGMILLER (1977) Science 197, 1284-1287.
- HEYLIGER C.E., V. PANAGIA y N.S. DHALLA (1981). J. Pharmacol and Exper. Therapeutics 217, 489-493.
- HIRSCHORN R. y E. SELA (1977). Cellular Immunol. 32, 350-360
- HITCHINGS M., y E.A. FALCO (1944). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 30, 294-297.
- HJERTEEN S. (1976). En "Methods in protein separation", vol. 2, pg. 233-243. Plenum Press. New York.
- HOAGLAND V.D. y J.R. FISCHER (1967). J. Biol. Chem. 242, 4341-4351.
- HODGES T.K. y R.T. LEONARD (1974). En "Methods in enzymology", vol. XXXII (Biomembranes, part B) pg. 392-406. 3ª edición. Academic Press. New York.
- HOFER H.O. (1968). En "Structure and function of nervous tissue", vol. I pg. 461-517. G.H. Bourne ed. Academic Press. New York.
- HOFFEE P.A., R. HAY y B.C. ROBERTSON (1978). En "Methods in enzymology" vol. LI, pg. 517-524. 3ª edición. Academic Press. New York.
- HOFFMAN W., D.A. PINK, C. RESTALL y D. CHAPMAN (1981). Eur. J. Biochem. 114, 585-589.
- HOFSTEE B.H.J. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1137-1144.
- HOFSTEE B.H.J. (1976). En "Methods of protein separation" vol. 2, pg. 245-278. Plenum Press. New York.
- HOLTON P. (1959). J. Physiol. 145, 495-504.

- HOLY A. y M. PILSEK (1976). Collect. Czchoslov. Chem. Commun. 41, 2433-2439.
- HOLLINS C., T.W, STONE y H. LLOYD (1980). Neuroscience Letters 20, 217-221.
- HOWARD W.J., L.A. KERSON y S.H. APPEL (1970). J. Neurochem. 17, 121-123.
- HOWELL R.R., J.N. LOEB y G.M. TOMKINS (1964). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52, 1241-1248.
- HULTIN H.O., J.D. EHMANN y R.L. MELNICK (1972). Food Science 37, 269-273.
- ICHISITA H., H. NAKAYAMA y A. ISHIDA (1972). Kumamoto Med. J. 25, 83-93.
- IMONDI A.R., M. LIPKIN y M.E. BALIS (1970). J. Biol. Chem. 245, 2194-2198.
- INDEX MERCK (1981) Merck & Co. Inc. Rahway.
- IPATA P.L. (1967). Nautre 214, 618-618.
- IPATA P.L. (1968). Biochemistry 7, 507-515.
- ISRAELSSON B. e I. TENGRUP (1980). Experientia 36, 257-258
- ITOH R., A. MITSUI y K. TSUSHIMA (1967). Biochim. Biophys. Acta 146, 151-159.
- ITOH R., C.H. USAMI, T. NISHINO y K. TSUSHIMA (1978). Biochim. Biophys. Acta 526, 154-162.
- IVERSEN L.L., J.F. MITCHELL y V. SRINIVASAN (1971). J. Physiol. (London) 212, 519-534.
- JENSEN K.F. (1976). Eur. J. Biochem. 61, 377-386.
- JENSEN K.F. (1978). Biochim. Biophys. Acta 525, 346-356.
- JORDAN W.K., R. MARCH , O.B. HOUCHIN y E. POPP (1959). J. Neurochem. 4, 170-174.
- JOSAN V. y P.S. KRISHNAN (1968). Biochem. Biophys. Res. Commun. 31 , 299-302.
- KAKIUCHI S., K. SOBUE y M. FUJITA (1981). FEBS Letters 132, 144-148.
- KALCKAR H.M. (1947 a). J. Biol. Chem. 167, 429-443.
- KALCKAR H.M. (1947 b). J. Biol. Chem. 167, 445-459.
- KALCKAR H.M. (1947 c). J. Biol. Chem. 167, 461-475.

- KAMATH S.A. y K.A. NARAYAN (1972). *Anal. Biochem.* 48, 53-61.
- KATSUTA K., Y. TAMAI, T. WATANABE, S. FUJITA y M. SATAKE (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 507, 271-279.
- KIANG W.L., C.P. CROCKETT, R.K. MARGOLIS y R.U. MARGOLIS (1978). *Biochemistry* 17, 3841-3848.
- KIM B.K., S. CHA, y R.E. PARKS Jr. (1968). *J. Biol. Chem.* 243, 1763-1770.
- KIM B.K., S. CHA, y R.E. PARKS Jr. (1968 b). *J. Biol. Chem.* 243, 1771-1776.
- KISHI K. (1969). *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 16, 289-302.
- KIZAKI H. y T. SAKURADA (1977). *Keio J. Med.* 26, 99-104.
- KLEIHUES P., K. KOBAYASHI y K.A. HOSSMANN (1974). *J. Neurochem.* 23, 417-425.
- KLUGE H., W. HARTMANN, V. WIECZOREK y W. ZAHLTEN (1974). *Acta Biol. Med. Ger.* 33, 49-56.
- KORN E.D., y J.M. BUCHANAN (1955). *J. Biol. Chem.* 217, 183-191.
- KOVAROVA H. (1976). *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 41, 2821-2815.
- KRENITSKY T.A. (1968). *J. Biol. Chem.* 243, 2871-2875.
- KRENITSKY T.A., G.B. ELION, R.A. STRELITZ y G.H. HITCHINGS (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 2675-2682.
- KRENITSKY T.A., G.B. ELION, A.M. HENDERSON y G.H. HITCHINGS (1968 a). *J. Biol. Chem.* 243, 2876-2881.
- KRENITSKY T.A., G.B. ELION, A.M. HENDERSON y G.H. HITCHINGS (1968 b). *J. Biol. Chem.* 243, 2876-2881.
- KRISHNAN P.S. y K.S. KUMAR (1973). *Biochem. J.* 131, 683-687
- KUMAR S. (1970). *Specialia* 15, 217-217.
- KUMAR S. y P.S. KRISHNAN (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 600-608.
- KUMAR S. y M. RATHI (1976). *Neuroscience* 3, 163-165.
- KUMAR S., K.K. TEWARI y P.S. KRISHNAN (1965). *Biochem. J.* 95, 797-802.
- KUMAR S., K.K. TEWARI y P.S. KRISHNAN (1966). *J. Neurochem.* 13, 1550-1552.

- KUMAR S., V. JOSAN, K.C.S. SARGER, K.K. TEWARI y P.S. KRISHNAN (1967). *Biochem. J.* 102, 691-704.
- KUMAR K.S., A. SITARAMAYA y P.S. KRISHNAN (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 1002-1007.
- KUMAR K.S., A. SITARAMAYA y P.S. KRISHNAN (1972). *Biochem. J.* 128, 1079-1088.
- LAMIRANDE G. de, C. ALLARD, y A. CANTERO (1958). *Cancer Res.* 18, 952.
- LAMIRANDE G. de, S. BOILEAU y R. MORAIS (1966). *Canad. J. Biochem.* 44, 273-279.
- LAPI L., y S. COHEN (1977). *Biochem. Pharmacol.* 26, 71-76.
- LAZO P.A., y A. SOLS (1979). *FEBS Letters* 98, 88-90.
- LEE P.C., J.S. NICKELS y J.R. FISHER (1973). *Arch. Biochem. Biophys.* 158, 677-680.
- LEE S. (1969). *Korean Central J. Med.* 17, 421-438.
- LEE T.C., D.C. SWARTZENDRUBER y F. SNYDER (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 748-755.
- LEHNINGER A.L. (1978). En "Bioquímica". 2ª edición. Editorial Omega.
- LELIEVRE L., A. ZACHOWSKI, R. MAGET-DANA, J. AUBRY y G. JONKMAN-BARK (1977). *Eur. J. Biochem.* 80, 185-191.
- LERNER M.H. y B.A. LOWY (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 959-966.
- LESCH M. y W.L. NYHAM (1964). *Am. J. Med.* 36, 361-370.
- LEVIN S.J. y O. BODANSKI (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 51-56.
- LEVITAN I.B., W.E. MUSHYNSKI y G. RAMIREZ (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 5376-5381.
- LEWIS A.S. y M.D. GLANTZ (1976). *Biochemistry* 15, 4451-4456
- LILLIE L. y S.S. COHEN (1977). *Biochem. Pharmacol.* 26, 71-76
- LISOWSKI J. (1966). *Biochim. Biophys. Acta* 113, 321-331.
- LKB (1976) "Enfoque isoeléctrico".
- LKB (April 1976). *Appl. Note.*
- LODISH H. y J. ROTHMAN (1979, Marzo). En "Investigación y Ciencia". pg. 20-37.
- LOEB J.N., R.R. HOWELL y G.H. TOMKINS (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 2069-2074.

- LOWRY O.M., N.J. ROSEBROIG, A.L. FARR y R. RANDALL (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- LUKACOVIC M.F., M.B. FEINSTEIN , R.I. SHA'AFI y S. PERRIE (1981). *Biochemistry* 20, 3145-3151.
- MA P.F. y J.R. FISCHER (1968 a). *Biochim. Biophys. Acta* 159, 153-159.
- MA P.F. y J.R. FISCHER (1968 b). *Comp. Biochem. Physiol.* 27, 687-694.
- MACKLER B. (1957). En "Methods in enzymology" vol X pg. 551-553. 3ª edición. Academic Press. New York.
- MAGASANIK B. (1957). *Ann. Rev. Microbiol.* 11, 221-252.
- MAGASANIK B. (1962). En "The bacteria" vol. 3. pg. 295 I.C. Gunsalus y R.V. Stanier eds. Academic Press. New York.
- MAGUIRE M.H. y M.K. SIM (1971). *Eur. J. Biochem.* 23, 22-29.
- MAHLER H.R. y B.J. BROWN (1968). *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 387-400.
- MAHLER H.R. y E.M. CORDES (1971). En "Química biológica" pg. 413-423. Editorial Omega.
- MALLOL J. (1980). Tesis Doctoral. Barcelona.
- MALLOL J. y J. BOZAL (1982 a). *J. Neurochem.* En curso de publicación.
- MALLOL J. y J. BOZAL (1982 b). *J. Neurochem.* en curso de publicación.
- MANGANIELLO V.C. y A.H. PHILLIPS (1965). *J. Biol. Chem.* 240, 3951-3959.
- MANSOOR M., G.P. TALWAR y G.D. KALYANAKAR (1963). *Biochim. Biophys. Acta* 77, 307-317.
- MANZANERO J.C. (1978). Tesis Doctoral. Barcelona.
- MARKLEY H.G., L.A. FAILLACE y E. HEZEY (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 309, 23-31.
- MARLEY E. y G. NISTICO (1972). *British J. Pharmacol* 46, 619-636.
- MARTINEZ-FARNOS L., S. GUBERT y J. BOZAL (1978). *Rev. Esp. Fisiol.* 34, 205-212.
- MARTINEZ-FARNOS L., S. GUBERT y J. BOZAL (1978). *Rev. Esp. Fisiol.* 34, 295-300.
- MARZ R., R.M. WOHLHUETER y P.G.W. PLAGEMANN (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 2329-2338.

- MASTERS B.S.S., C.H. WILLIAMS Jr. y H. KAMIN (1957). En "Methods in Enzymology" vol. X, pg. 565-573. 3ª edición. Academic Press. New York.
- MASTERS C.J. (1977, marzo). Trends in Biochem. Science pg 66-67.
- MASTERS C.J. (1978 a, octubre). Trends in Biochemical Science pg. 206-208.
- MASTERS C.J. (1978 b, octubre). Trends in Biochemical Science pg N233-N234.
- MATHER I.H., C.S. NACE, V.G. JONHSON y R.A. GOLDSBY (1980) Biochem. J. 188, 925-928.
- MATTISSON A.G.M., R.G. JOHANSSON y S.L. BOSTROM (1972). Comp. Biochem. Physiol. 418, 475-482.
- MAUREL P. (1978). J. Biol. Chem. 253, 1677-1683.
- MEEK D.W., D.K. STRAUB y R.S. DRAGO (1960). J. Am. Chem. Soc. 82, 6013-6016.
- MELNICK R.L. y H.O. HULTIN (1973). J. Cell. Physiol. 81, 139-147.
- MERITS I., J.C. CAIN, E.J. RAZOK y F.N. MINARD (1969). Experientia 25, 739-740.
- MICHAELIS L. y M.L. MENTEN (1913). Biochem. Z. 49, 333.
- MILLS G.C., R.M. GOLDBLUM y F.C. SCHMALSTIEG (1981). Life Sciences 29, 1811-1820.
- MORA M. (1982). Tesis Doctoral. Barcelona.
- MORAIS R. e I.H. GOLDBERG (1967). Biochemistry 6, 2538-2545
- MOREL N. y F.M. MEUNIER (1981). J. Neurochem. 36, 1766-1773.
- MORGAN I.G., L.S. WOLFE, P. MANDEL y G. GOMBOS (1971). Biochim. Biophys. Acta 241, 737-751.
- MORGAN I.G., G. VINCENDON y G. GOMBOS (1973). Biochim. Biophys. Acta 320, 671-680.
- MORRE J. (1971). En "Methods in enzymology" vol. 22, pg. 138-139. 3ª edición. Academic Press. New York.
- MOYES I.C.A. (1973). J. Int. Med. Res. 1, 321-324.
- MUNRO H.N., E.J.T. McLEAN y H.J. HIRD (1964) J. Nutr. 83, 186-192.
- MURA U., F. SGARRELLA y P.L. IPATA (1978). J. Biol. Chem. 253, 7905-7909.

- MURAKAMI K. (1971). *Physiol. Chem. and Physics* 3, 336-342.
- MURAKAMI K., A. MITSUI y K. TSUSHIMA (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 235, 99-105.
- MURRAY A.W. (1971). *Ann. Rev. Biochem.* 40, 311-826.
- MURRAY A.W. y B. FRIEDRICHS (1969). *Biochem. J.* 111, 83-89.
- MUSTAFA S.J. y C.P. TEWARI (1970). *Biochim. Biophys. Acta* 198, 93-100.
- NAITO Y. y K. TSISHIMA (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 438, 159-168.
- NAKAGAWA S. y G. GUREFF (1973). *J. Neurochem.* 20, 1143-1149
- NAKAI K., S. TAKEMITSU, T. KAWASAKI e I. YAMASHINA (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 193, 468-471.
- NAKAMURA S. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 426, 339-347
- NEMETHY G. y H.A. SCHERAGA (1962). *J. Phys. Chem.* 66, 1773-1789.
- NESKOVIC N.M., L.L. SARLIEVE y P. MANDEL (1973). *J. Neurochem.* 20, 1419-1430.
- NEU H.C. y E.B. WINSHELL (1970). *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 278.
- NEWBI A.C., J.P. LUZIO y C.N. HALES (1975). *Biochem. J.* 146, 625-633.
- NORSTRANDT I.F. y M.D. GLANTZ (1965). *V Proc. Int. Congr. Neuropathol. Zurich* pg. 963-965.
- NOVIKOFF A.B. y E. ESSNER (1962). *Fed. Proceedings.* 21, 1130-1 42.
- OHISALO J.J. y J.E. STOUFFER (1981). *Hormone and Metabolic Res.* 13, 222-224.
- OLSEN A.S. y G. MILMAN (1978). En "Methods in enzymology". vol. LI, pg 543-549. 3ª edición . Academic Press. New York.
- OMURA T., P. SIEKEVITZ y G.E. PALADE (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 2389-2396.
- OSBORNE W.R.A. y N. SPENCER (1973). *Biochem. J.* 133, 117-123
- OZAKI H. e I. SHIIO (1979). *J. Biochem.* 85, 1083-1089.
- PAGLIA D.E. y W.N. VALENTINE (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 7973-7977.

- PAHLMAN S., J. ROSENGREN y S. HJERTEEN (1977). *J. Chromat.* 131, 99-108.
- PALADE G.L. (1959). En "Subcellular particles" pg. 64-83. T. Hayashi ed. Ronald Press Company. New York.
- PANDA N.C., B.K. GOEL, M. MANSOOR y G.P. TALWAR (1962). *Biochem. J.* 82, 176-179.
- PARKS R.E. Jr y R.P. AGARWAL (1972). En "The enzymes" vol. VII pg. 483-514. 3ª edición. Academic Press. New York.
- PARKS R.E., J.D. STOECKLER, J.C. CAMBOR, T.M. SAVARESE, G.W. CRABTREE y S. CHU (1981). en "Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents" pg. 229-252. Academic Press. New York.
- PATTON S. y T.W. KEENAN (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 415, 273-309.
- PAUL M.I., B.R. DITZION y D.S. JANOWSKI (1970). *Lancet* I, 88
- PECHAN I. (1970). *Biologia* 25, 153-158.
- PEETERS C., M. de WOLF, A. LAGROU, G. van DESSEL, H.J. HILDERSON y W. DIERICK (1981). *Arch. Int. Physiol. Biochimie* 89, B123-B124.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (1977) "Percoll".
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (1980). "Agarosa IEF".
- PILCHER C.W.T. y T.G. SCOTT (1967). *Biochem. J.* 104, 41-42.
- PINK D.A. y D. CHAPMAN (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1542-1546.
- PINTO B. (1970). *Rev. Esp. Fisiol.* 26, 157-165.
- POLYAKOWA N.H. y M.K. MALISHEVA (1961). *Ukrain. Biokhim. Zhur.* 33, 713-730.
- PORATH J., L. SUNDBERG, N. FORNSTEDT e I. OLSSON (1973). *Nature* 245, 465-466.
- PRITCHARD J.B., N. O'CONNOR, J.M. OLIVER y R.D. BERLIN (1975). *Am. J. Physiol.* 229, 967-972.
- PUIG J., A. CORTES y J. BOZAL (1980). *Int. J. Biochem.* 11, 229-236.
- PULL I. y H. McILWAIN (1972 a). *Biochem. J.* 126, 965-973.
- PULL I. y H. McILWAIN (1972 b). *Biochem. J.* 130, 975-981.
- PULL I. y H. McILWAIN (1973). *Biochem. J.* 136, 893-901.

- PULL I. y H. McILWAIN (1974). *Biochem. J.* 144, 37-41.
- QUIRIN-STRICKER C. y P. MANDEL (1967). *Bull. Soc. Chim. Biol.* 49, 1517-1528.
- RABINOWITZ J.C. y H.A. BARKER (1956). *J. Biol. Chem.* 218, 161-173.
- RAMACHANDRAN M. y G.Y.N. IVER (1976). *Clin. Chim. Acta* 40, 281-284.
- REID E. (1967). En "Enzyme Cytology" pg. 321-350. Academic Press. New York.
- REID E., A.A.B. EL-AASER, M.K. TURNER y G. SIEBERT (1964) *Hoppe Zeyler's Z. Physiol. Chem.* 339, 135-149.
- REIS J.L. (1950). *Biochem. J.* 46, xxi-xxii.
- REIS J.L. (1951). *Biochem. J.* 48, 548-551.
- REYNOLDS E.S. (1963). *J. Cell. Biol.* 17, 208-212.
- RHODIN J.A.G. (1963). En "Atlas of ultrastructure" pg. 44-45 W.B. Saunders Co. Philadelphia.
- RIEMER B. y C.C. WIDNELL (1975). *Arch. Biochem. Biophys.* 171, 343-347.
- RODERMUND O.E. y G. KLINGMUELLER (1972). *Acta Fac. Med. Univ. Brun.* 40, 195-196.
- ROODYN D.B. (1957). *Biochim. Biophys. Acta* 25, 129-131.
- ROODYN D.B., K.B. FREEMAN y J.R. TATA (1965). *Biochem. J.* 94, 628-641.
- ROSENBLOOM F.M., W.N. KELLEY, J. MILLER, J. HENDERSON y J. F. SEEGMILLER (1967). *J. Am. Med. Assoc.* 202, 175.
- ROSSI C., G. HAKIM, y G. SOLAINI (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 526, 235-246.
- ROY J.E. (1966). *Canad. J. Biochem.* 44, 1093- 1098.
- ROY J.E. y K.L. ROY (1967). *Canad. J. Biochem.* 45, 1263-1269
- RUBIO R., y R.M. BERNE (1969). *Circ. Res.* 25, 407-415.
- RUBIO R., R.M. BERNE, E.L. BOCKMAN y R.R. CURNISH (1975). *Am. J. Physiol.* 228, 1896-1902.
- SABATINI D.D., Y. TASHIRO y G.E. PALADE (1966). *J. Molec. Biol.* 19, 503-524.
- SAGRISTA M.L. (1979). *Tesina. Barcelona.*

- SAITO D., C.R. STEINHART, D.G. NIXON y R.A. OLSSON (1981). *Circul. Res.* 49, 1262-1267.
- SANGER K.C. y S.K. SUDHIR (1970). *Enzymologia* 39, 49-56.
- SCAZZUCHIO C. y A.J. DARLINGTON (1968). *Biochim. Biophys. Acta.* 166, 557-568.
- SCOTT J. (1967). *J. Comp. Neurol.* 129, 97-113.
- SCOTT-BURDEN T. y A.O. HAWTREY (1969). *Biochem. J.* 115, 1063-1069.
- SCHENKMAN J.B. y D. CINTI (1972). *Life Sci.* 11, 247-257.
- SCHMIDT E. (1974). En "Methods of enzymatic analysis" vol. 2, pg. 650-656. Academic Press. New York.
- SCHMIDT G. (1935). *Z.S. Physiol. Chem.* 208, 185.
- SCHNEIDER W.C. y G.H. HOGEBROOM (1950). *J. Biol. Chem.* 183, 123-128.
- SCHRADER J., S. NESS y E. GERLASCH (1977). *Pflugers Arch.* 369, 251-257.
- SCHUBERT P. y G. W. KREUTZBERG (1975). *Brain. Res.* 85, 317-319.
- SEEGMILLER J.E. (1976). En "Advances in human genetics" Vol. 6 pg. 75-174. Plenum Press. New York.
- SEEGMILLER J.E. , F.M. ROSENBLOOM y W.N. KELLEY (1967). *Science* 155, 1682-1684.
- SERRA M.C., G. FALCONE, G. CERCIGNANI y P.L. IPATA (1971). *FEBS Letters* 18, 335-338.
- SHEEN M.R., B.K. KIM y R.E. PARKS Jr. (1968). *Molec. Pharmacol.* 4, 293-299.
- SHIIO I. y H. OZAKI (1978). *J. Biochem.* 83, 409-421.
- SHINOHARA K. y K.R. TANAKA (1979). *Hum. Genetics* 51, 107-111.
- SHNEOUR E.A. e I.M. HANSEN (1971). *J. Neurochem.* 18, 1345-1349.
- SHOCHET S.S. Jr. (1972). En "Structure and function of Nervous tissue" Vol IV. pg. 129-177. G.H. Bourne ed. Academic Press.

- SIEGENBEEK VAN HEUKELOM L., H. ABARTSTRA, A. BOOM y G.E. STAAL Jr. (1976). Clin. Chim. Acta. 72, 109-115.
- SIEGENBEEK VAN HEUKELOM L., G. STAAL, J.W. STOOP, B. ZEEGERS, M. VLIST y H. ABARTSTRA (1976 b). Clin. Chim. Acta 72, 117-124.
- SIEGENBEEK VAN HEUKELOM L., I.W.N. AKKERMAN, G.E. STAAL, C.H. DEBRUYN, J.W. STOOP, B.J. ZEEGERS, P.K. DEBREE y S.K. WADMAN (1977). Clin. Chim. Acta 74, 271-279.
- SIEKEVITZ P. y G.E. PALADE (1960). J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 619-630.
- SIEKEVITZ P., G.E. PALADE, G. DALLNER, I. OHAD y T. OMURA (1967). En "Organizational Biosynthesis". pg. 331-347. Academic Press. New York.
- SILINSKY E.M. (1975). J. Physiol. (London). 247, 145-162.
- SIMMONS N.L. (1981). Br. J. Pharmacol. 73, 379-384.
- SIMON K., E.R. CHAPLIN e I. DIAMOND (1977). Anal. Biochem. 79, 571-574.
- SIMON N.L., R.J. BANER y R.L. TOLMAN (1970). Biochemistry 9, 573-577.
- SINGER S.J. (1972). Science 175, 720-731.
- SINGER S.J. (1974). An. Rev. Biochem. 43, 805-833.
- SITARAMAYA A., S. KRISHNAN, S. ALI y K.S. KUMAR (1974). Biochem. J. 138, 143-146.
- SIXMA J.J., J.P.M. LIPS, A.M.C. TRIESCHNIGG y H. HOLMSEN (1976). Biochim. Biophys. Acta 443, 33-48.
- SKILLETER D.N. y E. KUN (1970). Federation Proceedings 29, 930.
- SMITH C.M., L.M. ROVAMO, M.P. KEKOMAKI y K.O. RAIVIO (1977). Canad. J. Biochem. 55, 1134-1139.
- SNEADER W.E., A.T. FLORENCE y E. McCOLL (1971). J. Pharm. Pharmacol. 23, 2525.
- SNYDER F.F., M.S. HERSHFELD y J.E. SEEGMILLER (1978). Cancer Res. 38, 2357-2362.
- SOLS A. y R.K. CRANE (1954). J. Biol. Chem. 210, 581-595.
- SONG C.S. y O. BODANSKY (1966). Biochem. J. 101, 5c-6c.

- SONG C.S. y O. BODANSKY (1967). J. Biol. Chem. 242, 694-699.
- SOLLER M., M. KOENIG, R. MYLROIE, C. HUGHES y C.Y. LU (1973). J. Neurochem. 21, 557-572.
- SOTTOCASSA G.L., B. KUYLENTIerna, L. ERNSTER y A. BERGS-TRAND (1967). En "Methods in enzymology". Vol. X. pg. 448-463. 3ª ed. Academic Press. New York.
- SOUTHARD J.H. y H.O. HULTIN (1972 a). Arch. Biochem. Biophys. 153, 468-474.
- SOUTHARD J.H. y H.O. HULTIN (1972 b). FEBS Letters 19, 349-351.
- SPENCER N., D.A. HOPKINSON y H. HARRIS (1968). An. Hum. Genetics 32, 9-14.
- SPYDEVOLD O. y B. BORREBAEK (1968). Biochim. Biophys. Acta 167, 292-301.
- STANLEY K.K., M. EDWARDS y J.P. LUZIO (1980). Biochem. J. 186, 59-69.
- STARLINGER H. (1967). Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 348, 864-870.
- STENZEL K.M. y A.L. RUBIN (1966). Science 153, 537-539.
- STERN J. (1952). J. Gen. Physiol. 35, 529-557.
- STOECKLER J.D., R.P. AGARWAL, K.C. AGARWAL, K. SCHMID y R.E. PARKS Jr. (1978 a). Biochemistry 17, 278-283.
- STOECKLER J.D., R.P. AGARWAL, K.C. AGARWAL y R.E. PARKS Jr. (1978 b). En "Methods in enzymology" 3ª ed. Vol. LI pg. 530-538. Academic Press. New York.
- STONE T.W., C. HOLLINS y H. LLOYD (1981). Brain Res. 207, 421-431.
- STRAUSS P.R., J.M. SHEEHAN y E.R. KASHKET (1976). J. Exp. Medicine 114, 1009-1021.
- STRITTMATTER P. y S.F. VELICK (1956). J. Biol. Chem. 221, 253-264.
- STRITTMATTER P., M.J. ROGERS y L. SPATZ (1972). J. Biol. Chem. 247, 7188-7194.
- SULLIVAN J.M. y J.B. ALPERS (1971). J. Biol. Chem. 246, 3057-3063.

- SURAN A.A. (1973). *Anal. Biochem.* 55, 593-600.
- SVENSSON H., G. DALLNER y L. ERNSTER (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 274, 447-461.
- TAFURI W.L. y T. de A. MARIA (1970). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 12, 298-309.
- TALWAR G.P., M. MANSOOR, B.K. GOEL y N.C. PANDA (1961). *J. Neurochem.* 8, 310-311.
- TALWAR G.P., N.C. PANDA, G.S. SARIN y A.J. TOLANI (1962). *Biochem. J.* 82, 173-175.
- TAMAI Y., S.M. ARAKI, K. KATSUTA y M. SATAKE (1974). *J. Cell. Biol.* 63, 749-758.
- TAMIR A., M.M. RAPPORT y L. ROIZIN (1974). *J. Neurochem.* 23, 943-949.
- TANAKA R., H. MORITA y A. TERUYA (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 298, 842-849.
- TANFORD C. (1973). En "The hydrophobic effect". pg. 1-200. John Wiley and Sons. New York.
- TANGEN O., J. JOHNSON y S. ORRENIUS (1973). *Anal. Biochem.* 54, 597-603.
- TATA J.R. (1967 a). *Nature* 213, 566-569.
- TATA J.R. (1967 b). *Biochem. J.* 105, 783-801 y 47p.
- TATA J.R. (1970). *Biochem. J.* 116, 617-630.
- TATA J.R. (1972). En "Subcellular components". pg. 185-213. G.D. Birnie ed. Butterworths. London.
- TATA J.R. y H.G. WILLIAMS-ASHMAN (1967). *Eur. J. Biochem.* 2, 366-374.
- TEDDE A., M.E. BALIS, R. SCHONBERG y P.P. TROTTA (1979). *Cancer Res.* 39, 3044-3050.
- THORNE L.J. (1963). *Biochim. Biophys. Acta* 73, 193-203.
- THUILLIER L., F. GARREAU y P. CARTIER (1981). *Cellular Immunol.* 63, 81-90.
- TJERNSHAUGEN H. (1978). *Biochem. J.* 169, 597-605.
- TJERNSHAUGEN H. y P. FRITZSON (1976). *Biochem. J.* 154, 77-80
- TJERNSHAUGEN H. y K. M. GAUTVIK (1976). *J. Cell. Physiol.* 88, 13-21.

- TRAMS E.G. y C.J. LAUTER (1975). *Biochem. J.* 152, 681-687.
- TRITSCH G.L. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 698-701.
- TRITSCH G.L. y J.L. ROSENFELD (1976). *J. Medicine* 7, 263-273
- TRITSCH G.L., P.R. NISWANDER, Y. ROSENFELD, A. NECHAEV y A. MITTELMAN (1976). *Mol. and Cell. Biochem.* 12, 93-101.
- TSOU K.C., C.S. CHENG, M.M. NECHLAS y H.M. SELIGMAN (1956). *J. Am. Chem. Soc.* 78, 6139-6144.
- UMEMORI-AIKAWA Y. y T. AIKAWA (1974). *Comp. Biochem. Physiol.* 49, 353-359.
- VALENTINE W.N., K. FINK, D.E. PAGLIA, S.R. HARRIS y W.S. ADAMS (1974). *J. Clin. Invest.* 54, 866-879.
- VALENTINE W.N., D.E. PAGLIA, K. FINK y G. MADOKORO (1976). *J. Clin. Invest.* 58, 926-933.
- VALENTINE W.N., D.E. PAGLIA, A.P. TARTAGLIA y F. GILSANZ (1977). *Science* 195, 783-785.
- VAN DER BERGHE G., C. VAN POTTELSBERGHE y H.G. HERS (1977). *Biochem. J.* 162, 611-616.
- VAN DER HOEVEN T.A. (1981). *Anal. Biochem.* 115, 398-402.
- VAN DER WEYDEN M.B. (1976). *British J. Haematology* 34, 159-165.
- VAN DER WEYDEN M.B. y W.N. KELLEY (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 5448-5456,
- VESTERBERG O. y B. BERGGREN (1966). *Arkiv för Kemi* 27, 119-127.
- VILELLA G. (1971). *Rev. Bras. Biol.* 31, 235-238.
- WARBURG O. y W. CHRISTIAN (1941). *Biochem. Z.* 310, 384-421.
- WATSON M.L. (1958). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 727-730.
- WEBER G., R.L. SINGHAL, N.B. STAMM, E.A. FISHER y M.A. MENTENDIEK (1964). *Adv. in Enzyme Regulation* 2, 1-38.
- WEIBEL E.R., W. STAUBLI, H.R. GNAGI y F.A. HESS (1969). *J. Cell. Biol.* 42, 68-91.
- WEIHING R.R., V.C. MANGANIELLO, R. CHIU y A. H. PHILLIPS (1972). *Biochemistry* 11, 3128-3135.
- WHITAKER J.R. y P.E. GRANUM (1980). *Anal. Biochem.* 109, 156-159.

- WHITE F.P., W.J. McBRIDE, H.R. MAHLER y W.J. MOORE (1972). J. Biol. Chem. 247, 1247-1256.
- WHITTAKER V.P., I.A. MICHAELSON y R.J.A. KIRKLAND (1964). Biochem. J. 90, 293-305.
- WIDNELL C.C. (1974). En "Methods in Enzymology" 3ª ed. Vol. XXXII. pg. 368-374. Academic Press. New York.
- WIDNELL C.C. y J.C. UNKELES (1968). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 1050-1052.
- WOJTCZAK L. y M.J. NALECZ (1979). Eur. J. Biochem. 94, 99 - 107.
- WOMBACHER H. (1978). FEBS Letters 85, 77-80.
- WONG P.C.L. y J.F. HENDERSON (1972). Biochem. J. 129, 1085-1094.
- WOO Y.T. y J.F. MANERY (1975). Biochim. Biophys. Acta 397, 144-152.
- WORTMANN R.L., B.S. MITCHELL, N.L. EDWARDS e I.H. FOX (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2434-2437.
- YAMADA E.W. (1961). J. Biol. Chem. 236, 3043-3046.
- YARBROUGH G.G. y J.C. McGUFFIN-CLINESCHMIDT (1981). Eur. J. Pharmacol. 76, 137-144.
- YON R.J. (1972). Biochem. J. 126, 765-767.
- YOSHINO M., E. MIYAJIMA y K. TSUSHIMA (1979). J. Biol. Chem. 254, 1521-1525.
- ZACHOWSKI A. y J. AUBRY (1977). FEBS Letters 75, 197-200.
- ZACHOWSKI A., L. LELIEVRE, R. MAGET-DONA, J. AUBRY y G. JONKMAN-BARK (1977). Eur. J. Biochem. 80, 185-191.
- ZACHOWSKI A., W.H. EVANS y A. PARAF (1981). Biochim. Biophys. Acta 644, 121-126.
- ZIMMERMAN T.P., R.D. MIECH (1970). Cancer Res. 11, 87
- ZOMZELY C.E., S. ROBERTS y D. RAPAPORT (1964). J. Neurochem. 11, 567-582.